

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA
Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los
Alimentos



TESIS DOCTORAL

**Desarrollo de emulsiones dobles y emulsiones dobles
gelificadas como análogos de grasa y su aplicación en
productos cárnicos funcionales**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

María J. Freire Rodríguez

Directores

**Ricard Bou Novensa
Susana Cofrades Barbero
Francisco Jiménez Colmenero**

Madrid, 2018

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN, BROMATOLOGÍA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS



TESIS DOCTORAL

**Desarrollo de emulsiones dobles y emulsiones dobles
gelificadas como análogos de grasa y su aplicación en
productos cárnicos funcionales**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR PRESENTADA POR:

María J. Freire Rodríguez

DIRECTORES

Dr. Ricard Bou Novensa

Dra. Susana Cofrades Barbero

Prof. Francisco Jiménez Colmenero

MADRID, 2017



Universidad Complutense de Madrid
Facultad de Veterinaria
Departamento de Nutrición,
Bromatología y Tecnología de
Alimentos



Instituto de Ciencia y Tecnología de
Alimentos y Nutrición
Departamento de Productos

**Desarrollo de emulsiones dobles y emulsiones dobles gelificadas
como análogos de grasa y su aplicación en productos cárnicos
funcionales**

Memoria que presenta **María J. Freire Rodríguez** para optar al grado de
Doctor por la Universidad Complutense de Madrid.

Bajo la dirección de la Dr. Ricard Bou Novensa, la Dra. Susana Cofrades
Barbero y el Prof. Francisco Jiménez Colmenero

INSTITUTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS Y NUTRICIÓN
(ICTAN-CSIC)

Madrid, 2017

El Dr. Ricard Bou Novensa (Investigador *Ramón y Cajal*) del IRTA, la Dra. Susana Cofrades Barbero (Científico Titular) y el Prof. Francisco Jiménez Colmenero (Profesor de Investigación) del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición, (ICTAN-CSIC),

CERTIFICAN:

Que la presente memoria titulada **“Desarrollo de emulsiones dobles y emulsiones dobles gelificadas como análogos de grasa y su aplicación en productos cárnicos funcionales”**, presentada por María J. Freire Rodríguez para optar al grado de Doctor, ha sido realizada en el Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN-CSIC) bajo su dirección, y que, hallándose concluida, autorizan su presentación para que pueda ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firman la presente certificación en

Madrid,

Dr. Ricard Bou

Dra. Susana Cofrades

Prof. Francisco Jiménez

La presente memoria ha sido realizada en el Departamento de Productos del Instituto de Ciencia y tecnología de Alimentos y Nutrición, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (ICTAN-CSIC).

El trabajo ha sido financiado por los siguientes proyectos de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica (I+D+I):

- Proyectos: AGL2011-29644-C02-01, AGL2014-53207-C2-1-R, Intramurales CSIC 2014470E073 y 201470E056
- Proyecto Consolider Ingenio 2010: CARNISENUSA (CSD2007-00016)
- Beca del Ministerio de Economía y Competitividad: BES-2012-057977 y EEBB-I-14-08933



Unión Europea
Fondo Social Europeo



CSIC
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

**Consolider Ingenio
2010
Carnisenusa**

ÍNDICE

Abreviaturas	I
Resumen	V
Abstract.....	V
1. Introducción	1
1.1. Alimentos funcionales y su uso	3
1.1.1. <i>Posibilidades en el desarrollo de alimentos funcionales.....</i>	<i>5</i>
1.1.2. <i>Declaraciones nutricionales y de salud.....</i>	<i>6</i>
1.2. Carne y productos cárnicos en el marco de la alimentación funcional. Importancia en Europa y España.....	11
1.2.1. <i>Importancia de los nutrientes de la carne y su implicación en la salud.....</i>	<i>12</i>
1.2.2. <i>Componentes de la carne y relación con enfermedades crónicas no transmisibles (ENT)</i>	<i>20</i>
1.3. Estrategias de obtención de productos cárnicos más saludables	23
1.3.1. <i>Reducción del contenido de grasa</i>	<i>25</i>
1.3.2. <i>Mejora del perfil lipídico</i>	<i>26</i>
1.3.3. <i>Sistemas de mejora del perfil lipídico en productos cárnicos</i>	<i>29</i>
1.4. Nuevas estrategias de incorporación de aceites: emulsiones dobles	31
1.4.1. <i>Características generales de las emulsiones y de sus componentes.....</i>	<i>31</i>
1.4.2. <i>Emulsiones dobles, métodos de obtención y estabilidad.....</i>	<i>36</i>
1.4.3. <i>Avances en el desarrollo y funcionalidad de las emulsiones estructuradas</i>	<i>42</i>
1.5. Desarrollo de productos cárnicos más saludables.....	52
1.5.1. <i>Productos tipo gel/emulsión</i>	<i>53</i>
1.5.2. <i>Productos frescos: hamburguesas</i>	<i>56</i>
2. Objetivos	59
3. Material y métodos	63
3.1. Materias primas	66
3.2. Elaboración de las emulsiones	67
3.2.1. <i>Emulsiones simples</i>	<i>67</i>
3.2.2. <i>Emulsiones dobles</i>	<i>68</i>

3.2.3.	<i>Emulsiones estructuradas</i>	69
3.3.	Elaboración de productos cárnicos	70
3.3.1	<i>Sistemas modelo y salchichas tipo frankfurt</i>	70
3.3.2.	<i>Hamburguesas</i>	72
3.4.	Caracterización de las emulsiones	73
3.4.1.	<i>Composición</i>	73
3.4.2.	<i>Propiedades físico-químicas</i>	73
3.4.3.	<i>Análisis microbiológico</i>	77
3.5.	Caracterización de los productos cárnicos	78
3.5.1.	<i>Composición</i>	78
3.5.2.	<i>Propiedades físico-químicas</i>	79
3.5.3.	<i>Análisis microbiológico</i>	81
3.5.4.	<i>Análisis sensorial</i>	81
3.5.5.	<i>Análisis estadístico</i>	81
4.	Resultados	83
4.1.	Desarrollo y obtención de emulsiones dobles como sistemas de entrega de compuestos bioactivos que puedan emplearse como análogos de grasa	87
4.1.1	<i>Oxidative stability of meat systems made with W1/O/W2 emulsions prepared with hydroxytyrosol and chia oil as lipid phase</i>	89
4.1.2.	<i>Olive oil based edible W/O/W emulsions stability as affected by addition of some acylglycerides</i>	99
4.1.3.	<i>Comparison of simple, double and gelled double emulsions as hydroxytyrosol and n-3 fatty acid delivery systems</i>	111
4.1.4.	<i>Technological characteristics of cold-set gelled double emulsion enriched with n-3 fatty acids: Effect of hydroxytyrosol addition and chilling storage</i>	123
4.2.	Utilización de emulsiones dobles y dobles gelificadas como estrategia de desarrollo de productos cárnicos funcionales	133
4.2.1.	<i>Double emulsions to improve frankfurter lipid content: impact of perilla oil and pork backfat</i>	135
4.2.2.	<i>Gelled emulsions as delivery systems for hydroxytyrosol and n-3 fatty acids in healthy pork patties ..</i>	147

5. Discusión integradora.....	159
5.1. Desarrollo de emulsiones dobles y emulsiones dobles gelificadas	162
5.1.1. <i>Estudio nutricional de los análogos desarrollados.</i>	165
5.1.2. <i>Aspectos tecnológicos de los análogos de grasa</i>	167
5.2. Desarrollo de productos cárnicos funcionales.....	182
5.2.1. <i>Estudio nutricional de los productos cárnicos desarrollados</i>	184
5.2.2. <i>Caracterización de los productos: propiedades físico-químicas, texturales, microbiológicas y sensoriales</i>	191
6. Conclusiones.....	203
7. Bibliografía.....	209

Abreviaturas

ABREVIATURAS

H: Incremento de entalpía	HP: Índice de hidroperóxidos
AG: Ácidos Grasos	HXT: Hidroxitirosol
AGM: Ácidos Grasos Monoinsaturados	ISP: Aislado de proteína de soja
AGP: Ácidos Grasos Poliinsaturados	KSF: Test de Kramer (<i>Kramer shear force</i>)
AGS: Ácidos Grasos Saturados	LA: Ácidos linoleico
ALA: Ácido α -linolénico	LDL: Lipoproteína de baja densidad (<i>Low density lipoprotein</i>)
CE: Comisión Europea	n-3: Ácido graso omega-3
CLA: Ácido linoleico conjugado	n-6: Ácido graso omega-6
DE: Double Emulsion	NaCas: Caseinato sódico
DHA: Ácido docosahexaenoico	O/W: Aceite-en-agua (<i>oil-in-water</i>)
DSC: Calorimetría diferencial de barrido (<i>Differential Scanning Calorimetry</i>)	O ₁ /W/O ₂ : Aceite-en-agua-en-aceite (<i>oil-in-water-in-oil</i>)
ECV: Enfermedad Cardio-Vascular ED: Emulsión Doble	OMS: Organización Mundial de la Salud
EDG: Emulsión Doble Gelificada	PGPR: Poliglicerol del ácido polirricinoleico
EEUU: Estados Unidos de América	TBARS: Determinación de las sustancias reactivas con el ácido 2-tiobarbitúrico (<i>Thiobarbituric acid reactive substances</i>)
ENT: Enfermedad crónica no transmisible	TGM: Transglutaminasa microbiana
EPA: Ácido eicosapentaenoico	TPA: Análisis del Perfil de Textura (<i>Texture Profile Analysis</i>)
FAME: Fatty acid methyl ester	UE: Unión Europea
G': Módulo de almacenamiento o elástico (en reología).	W/O: agua-en-aceite (<i>water-in-oil</i>)
G'': Módulo de pérdidas o viscoso (en reología).	W ₁ /O/W ₂ : Agua-en-aceite-en-agua (<i>water-in-oil-in-water</i>)
GDE: Gelled Double Emulsion	WPI: Aislado de proteína de suero lácteo
HDL: Lipoproteína de alta densidad (<i>High Density Lipoprotein</i>)	δ : Ángulo de fase (en reología)

Resumen/Abstract

RESUMEN

La aplicación de procesos de reformulación constituye una de las principales estrategias empleadas en el desarrollo de productos cárnicos más saludables. Entre ellas se encuentran aquellas centradas en la mejora del perfil de ácidos grasos (AG), sustituyendo la grasa animal por otra de origen vegetal y/o marino cuyas características sean más acordes con las recomendaciones de salud. Esto supone favorecer la presencia de menores proporciones de ácidos grasos saturados (AGS) y mayores de ácidos grasos monoinsaturados (AGM) o ácidos grasos poliinsaturados (AGP), mejor relación AGP $n-6/n-3$ y AGP/AGS y, si es posible, sin colesterol. En este contexto, las emulsiones dobles de agua-en-aceite-en-agua ($W_1/O/W_2$, ED) ofrecen interesantes expectativas, al poder ser utilizadas tanto como sistemas de entrega de compuestos bioactivos, como para optimizar el contenido lipídico de los alimentos. Sin embargo, la naturaleza líquida de las ED presenta algunas limitaciones al mostrar propiedades físico-químicas muy diferentes de la grasa animal (sólida) a la que va a reemplazar, condicionando los atributos de calidad del nuevo producto. Es por ello que se está abordando el desarrollo nuevos sistemas de estructuración de emulsiones, a fin de obtener materiales lipídicos de naturaleza sólida muy similar a la grasa animal.

El objetivo principal de la tesis fue el desarrollo y aplicación de nuevos análogos de grasa en el diseño y obtención de productos cárnicos funcionales. En tal sentido, primeramente, se abordó la preparación de análogos de grasa basados en la elaboración de emulsiones dobles (ED) y emulsiones dobles gelificadas (EDG) diseñadas para encapsular compuestos bioactivos y mejorar el perfil lipídico de los productos cárnicos. Así, inicialmente, se diseñó una emulsión doble formulada con caseinato sódico (NaCas) y poliglicerol del ácido polirricinoleico (PGPR) como emulsionantes hidrófilico y lipofílico, respectivamente, diversos aceites (oliva, chía y perilla) como fase lipídica, e hidroxitirosol (HXT), encapsulado en la fase acuosa interna. Posteriormente con el propósito de mejorar la aptitud tecnológica de dicha ED se ensayaron varias opciones introduciendo modificaciones en las distintas fases de la $W_1/O/W_2$. Tales modificaciones afectaron fundamentalmente a la fase lipídica (O) mediante el empleo de mono- y di-acilglicéridos, y a la fase acuosa externa a través de la aplicación de distintos sistemas de gelificación en frío basados en la utilización de gelatina y de transglutaminasa microbiana (TGM). Ambos sistemas

(ED y EDG) se caracterizaron en base a sus propiedades físico-químicas, estabilidad oxidativa y microbiológica, tanto en el momento de su obtención como durante su conservación (4 °C).

Una vez obtenidos dichos análogos, se inició una segunda fase encaminada al desarrollo de productos cárnicos cocidos: sistema modelo y salchicha tipo frankfurt, así como en productos frescos tipo hamburguesa. Las consecuencias del proceso de reformulación fueron estudiadas evaluando aspectos tecnológicos, sensoriales, microbiológicos y nutricionales de los mismos.

A pesar de que tanto las ED como las EDG presentaron características similares a nivel nutricional, sus propiedades tecnológicas (físico-químicos) fueron claramente diferentes. Mientras que a temperatura ambiente las ED son líquidas, las EDG muestran una consistencia sólida muy próxima a la de la grasa animal, exhibiendo características reológicas propias de un gel. Ambos sistemas presentan protección frente a los fenómenos de oxidación lipídica, así como capacidad antioxidante, comportamiento atribuible, entre otras causas, a la actividad antioxidante de algunos componentes como son el NaCas, al HXT y adicionalmente a la gelatina en la EDG.

Las estrategias de reformulación llevadas a cabo, permiten la obtención de salchichas tipo frankfurt y hamburguesas con una composición lipídica más acorde con las recomendaciones de AG establecidas. Tal modificación supone que en ambos productos concurren las condiciones necesarias para mostrar diversas declaraciones nutricionales y de propiedades saludables, en el marco legislativo europeo. Por otro lado, las estrategias empleadas permiten el desarrollo de productos con adecuada viabilidad tecnológica, sensorial y sin limitaciones, en términos de seguridad o vida útil, adicionales a las de un derivado cárnico de naturaleza análoga.

Todo lo cual permite establecer que las novedosas estrategias de reformulación llevadas a cabo en el empleo de ED y EDG abren nuevas posibilidades en la aplicación de las estrategias tecnológicas de diseño y obtención de sustitutos de grasa animal. Su composición y estructura compartimentalizada capaz de dotarles de actividad multifuncional (tecnológica y a nivel de impacto en el organismo), asociados a su naturaleza sólida próxima a la de la grasa animal, proporciona interesantes posibilidades de reformulación de productos cárnicos funcionales, como es el caso de salchichas tipo frankfurt y hamburguesas.

ABSTRACT

The application of reformulation processes is one of the main strategies employed in the development of healthier meat products. Those strategies focused on the improvement of the fatty acid profile and the replacement of animal fat with vegetable and/or marine oils whose characteristics are more in line with health recommendations. This means to decrease the presence of saturated fatty acids and increase that of monounsaturated and polyunsaturated fatty acids, better *n-6/n-3* polyunsaturated fatty acids and polyunsaturated/saturated fatty acids ratios, and, if possible, without cholesterol. In this context, water-in-oil-in-water double emulsions (W1/O/W2, DE) offer interesting possibilities because they can be used as delivery systems of the bioactive compounds and optimize the lipid content of food products. However, the liquid nature of the DE presents some limitations due to the different physicochemical properties of the animal fat (solid) which is going to be replaced, thus conditioning the quality attributes of the new product. Hence, the development of new methods for the structuring of emulsions have been addressed to obtain solid lipid materials that are similar to animal fat.

The aim of this thesis was the development and application of new fat analogues in the design and development of functional meat products. In this regard, firstly, the preparation of fat analogues based on the elaboration of double emulsions (DE) and gelled double emulsions (GDE) designed to encapsulate bioactive compounds and improve the lipid profile of meat products was addressed. Hence, initially, a double emulsion formulated with sodium caseinate (NaCas) and polyglycerol ester of polyricinoleic acid (PGPR) as hydrophilic and lipophilic emulsifiers respectively, various vegetable oils (olive, chia and perilla) as lipid phase, and hydroxytyrosol (HXT), encapsulated in the internal aqueous phase, was designed. Subsequently, aimed at improving the technological aptitude of DE, several modifications in the different phases of the W1/O/W2 have been tested. Such modifications mainly affected the lipid phase (O) through the use of mono- and di-acilglycerides, and the external aqueous phase through the application of different cold gelation processes based on the use of gelatin and microbial transglutaminase (TGM). Both systems (ED and EDG) were characterized according to their physical-chemical properties, oxidative and microbiological stability, after elaboration and during their storage at 4 °C.

Once these analogs were obtained, a second phase was initiated aimed at the development of cooked meat products: model system and frankfurter sausage, as well as in raw hamburger. The consequences of the reformulation process were studied by evaluating their technological, sensory, microbiological and nutritional characteristics.

Although both the DE and GDE presented similar characteristics at nutritional level, their technological properties (physicochemical) were clearly different. While DEs were liquid at room temperature, GDEs showed a solid-like structure similar to animal fat, exhibiting rheological characteristics typical of a gel. Both systems presented protection against the phenomena of lipid oxidation, as well as antioxidant capacity. This behavior was due, among other causes, to the antioxidant activity of some components such as NaCas, HXT, and, additionally, to the gelatin in the GDE.

The reformulation strategies can be used to produce frankfurter sausages and burgers with a lipid composition more in accordance with the established recommendations for fatty acids. Such modifications fulfilled the required conditions to label health claims within the European legislative framework. On the other hand, the employed strategies allow the development of products with adequate technological, sensory and no limitations, in terms of safety or shelf-life, in addition to those of a meat derivative of an analogous nature.

All of which makes it possible to establish that the novel strategies of reformulation based on the use of DE and GDE open up new possibilities in the application of technological strategies for designing and obtaining animal fat substitutes. Their composition and compartmentalized structure provide them with multifunctional activity (technological and impact level in the body), along with their solid nature similar to animal fat, and offer interesting possibilities for reformulation of functional meat products, as is the case of frankfurter sausages and hamburgers.

Introducción

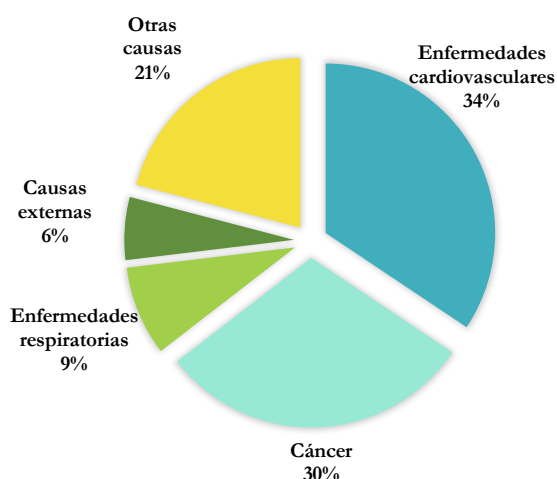
1. INTRODUCCIÓN

1.1. ALIMENTOS FUNCIONALES Y SU USO

Desde los años 80 la esperanza de vida en la Unión Europea (UE) ha aumentado considerablemente, pasando desde los 72,8 años (según datos registrados en la UE de los 18) hasta los actuales 80,9 años (datos de la UE de los 28 países). Los tres países con mayor expectativa de vida son: España, Italia y Francia; concretamente en España la mortalidad en los años 80 se encontraba en 75,4 años hasta alcanzar los 83,3 años en el 2013. Este aumento en la longevidad en la población española y europea puede ser debido a diversos factores en gran medida asociados al aumento del poder adquisitivo.

Según los datos publicados por Eurostat (OECD/EU, 2016) las principales causas de muerte entre los europeos son: las enfermedades cardiovasculares (ECV) con un 40%, el cáncer con un 26%, las enfermedades respiratorias con un 8%, y aquellas otras que engloba distintos orígenes 28% (suicidio, accidentes de tráfico, etc.) (**Figura 1**). Por lo tanto, las enfermedades no transmisibles (ENT) son las principales causas de defunción en la sociedad europea.

Hombres



Mujeres

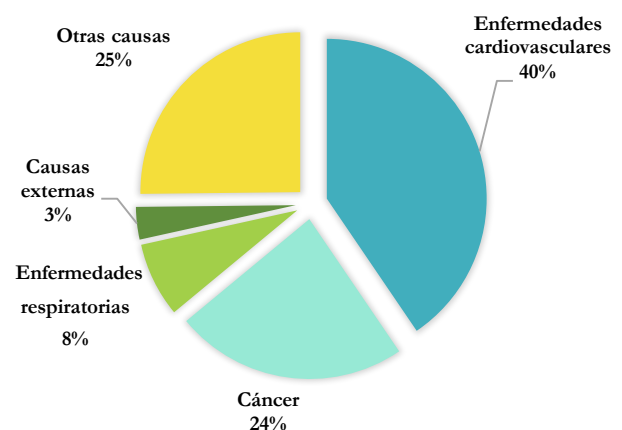


Figura 1. Principales causas de muerte de hombres y mujeres en de la Unión Europea en el 2013 (OECD/EU, 2016).

Distintos estudios han concluido que la morbilidad de las ENT está potenciada por hábitos de vida poco saludables y ciertos factores de riesgo. Estos pueden ser:

- Modificables como: mala alimentación, sedentarismo, tabaco y consumo nocivo de alcohol.
- Fisiológicos-metabólicos tales como: hipertensión arterial, sobrepeso/obesidad, hiperglucemia e hiperlipidemia.
- Otros factores recientemente identificados como: el estrés, los agentes psico-sociales el medio-ambiente, la predisposición genética o la salud laboral.

Por este motivo, la Unión Europea junto con la Organización Mundial de la Salud (OMS) plantean nuevas políticas de intervención que aborden eficazmente la limitación de los distintos hábitos de riesgo. De igual modo se están estableciendo distintos programas de reeducación y concienciación de la sociedad sobre la importancia de la alimentación equilibrada, el consumo de alimentos más saludables y la mejora de los hábitos de vida, englobados en el *Plan de acción mundial para la prevención y el control de las enfermedades no transmisibles 2013-2020* (OMS, 2013). Los distintos programas activos tanto a nivel mundial como regional se centran en el fomento de dietas saludables que presenten unas directrices y características comunes, teniendo como objetivo:

- Una reducción del 30% de su contenido en sodio en la dieta y disminución de la prevalencia de sobrepeso y obesidad.
- La eliminación de ácidos grasos (AG) de tipo *trans* y su sustitución por AG insaturados.
- La sustitución de ácidos grasos saturados (AGS) por AG insaturados.
- Disminuir la concentración de azúcares libres tanto en los alimentos como en las bebidas no alcohólicas.
- Rebajar la densidad calórica de los alimentos y el tamaño de las raciones.

Desde hace unas décadas, la sociedad ha venido mostrando un creciente interés sobre la nutrición y su implicación en la salud. De este modo, surge a lo largo de los años 80 en Japón y Corea del Sur el concepto de *alimentos que pueden mejorar la salud*. Concretamente, en el país nipón, tras el estudio de las relaciones entre distintos conceptos: nutrición, satisfacción sensorial, fortificación y modulación de los sistemas fisiológicos, se acuñó el término alimento funcional como “alimento fortificado con biocompuestos que produce un efecto beneficioso sobre la salud” (Siro et al., 2008). Por primera vez, en los 90, el gobierno japonés, con el fin de ayudar a promover la ingesta de los ingredientes con los que obtener una salud óptima, legisló la definición “alimentos de uso

específico para la salud” (*Foods for Specific Health Use*, FOSHU) y los requisitos que debían cumplir (Hardy, 2000). Posteriormente el auge de estos alimentos fue expandiéndose en Estados Unidos de América (EEUU) y en Europa. Aunque a nivel mundial no se ha establecido una definición única, en Europa el abordaje científico se realizó en 1998 por un comité de expertos bajo la supervisión de la UE y coordinado por el Instituto Internacional de Ciencias de la Vida (*International Life Science Institute Europe*, ILSI Europe). Dicho comité propuso la siguiente definición operativa (Diplock et al., 1999):

“Un alimento puede considerarse funcional si se demuestra satisfactoriamente que ejerce un efecto beneficioso sobre una o más funciones selectivas del organismo, además de sus efectos nutritivos intrínsecos, de modo tal que resulte apropiado para mejorar el estado de salud y bienestar, reducir el riesgo de enfermedad o ambas cosas. Así mismo, debe presentar una apariencia similar a un alimento convencional, no puede ser un comprimido, cápsula o ninguna otra forma de suplemento alimenticio y por tanto debe ser consumido en cantidades habituales y considerarse un componente más de la dieta. Su efecto beneficioso puede afectar en toda la población como en un grupo particular.”

1.1.1. Posibilidades en el desarrollo de alimentos funcionales

El desarrollo de alimentos funcionales como los lácteos, bebidas, cereales y derivados, carnes, etc., puede llevarse a cabo mediante la utilización de distintas estrategias (Roberfroid, 2000):

- Incrementar o incorporar: el proceso de incrementar supone adicionar un nutriente al producto alimentario para que este alcance un nivel más elevado que el que presenta normalmente; mientras que la incorporación implica la adición de un nivel apropiado de un nutriente inexistente en esa matriz. En ambos casos suelen ser muy comunes el uso de minerales y vitaminas. Son bien conocidos los ejemplos de enriquecimiento en calcio en los productos lácteos para aumentar la densidad mineral ósea de la población, el fortalecimiento en folatos para evitar los defectos del tubo neuronal en los recién nacidos, o la incorporación de prebióticos.
- Eliminar o reducir: está encaminada a reducir de la presencia de componentes que interfieran en el valor nutricional o que puedan causar efectos negativos a los consumidores. Por ejemplo, los alérgenos, sodio, grasa saturada, etc.
- Remplazar: se trata de sustituir un componente, generalmente un macronutriente, que consumido en cantidades excesivas puede generar efectos adversos sobre la salud, por

otro con propiedades beneficiosas. Por ejemplo, sustituir la grasa saturada en los productos cárnicos por grasa mono o poliinsaturada (origen vegetal o marino).

- Mejorar: supone potenciar las consecuencias fisiológicas saludables de un componente naturalmente presente en el alimento, aumentar su biodisponibilidad y/o su estabilidad.
- Combinación de ellas: muchas veces no se usa una sola de estas opciones, sino más bien una combinación de ellas.

1.1.2. Declaraciones nutricionales y de salud

Una vez demostradas las propiedades saludables de un alimento es importante transmitir esos beneficios al consumidor, siendo la publicidad y el etiquetado los canales más adecuados. Para ello, la UE a través de su parlamento aprobó, el 20 de diciembre de 2006, el reglamento de la comisión europea (CE) nº 1924/2006 con el propósito de establecer los criterios básicos para la creación y utilización de las declaraciones nutricionales y de propiedades de salud.

Conforme a lo establecido en su artículo 2, se entiende por **declaración nutricional** “cualquier declaración que afirme, sugiera o dé a entender que un alimento posee propiedades nutricionales benéficas específicas con motivo de su aporte energético y los nutrientes u otras sustancias que: contiene, no contiene, o contiene en proporciones reducidas o incrementadas”. Para ello, este Reglamento decretó una lista positiva de declaraciones nutricionales, que sufrió distintas ampliaciones tanto en el año 2010 como en el 2012, nº116/2010 y 1047/2012 (**Tabla 1**).

A su vez, el reglamento CE 1924/2006 describe las declaraciones de propiedades saludables o alegaciones de salud como “cualquier declaración que afirme, sugiera o dé a entender que existe una relación entre una categoría de alimentos, un alimento o uno de sus constituyentes, y la salud”. Las declaraciones de propiedades saludables se encuadran en tres bloques:

Tabla 1. Declaraciones nutricionales autorizadas de acuerdo al reglamento (CE) n° 1924/2006 y sus modificaciones posteriores (Reglamento n° 116/2010 y 1047/2012).

Bajo valor energético	Fuente de proteínas
Valor energético reducido	Alto contenido en proteínas
Sin aporte energético	Fuente de (nombre de las vitaminas) y/o (nombre de los minerales)
Bajo contenido en grasa	Alto contenido de (nombre de las vitaminas) y/o (nombre de los minerales)
Sin grasa	Alto contenido de (nombre de las vitaminas) y/o (nombre de los minerales)
Bajo contenido en grasas saturadas	Contiene (nutriente u otras sustancias)
Sin grasas saturadas	Mayor contenido de (nombre del nutriente)
Bajo contenido en azúcares	Contenido reducido de (nombre del nutriente)
Sin azúcares	Light/lite (ligero)
Sin azúcares añadidos	Naturalmente
Bajo contenido en sal o en sodio	Fuente de ácidos omega-3
Muy bajo contenido en sal o sodio	Alto contenido de ácidos grasos omega -3
Sin sal o sin sodio	Alto contenido de grasas monoinsaturadas
Sin sal o sodio añadido	Alto contenido de grasas poliinsaturadas
Fuente de fibra	Alto contenido de grasas insaturadas
Alto contenido en fibra	

Nutrientes: Proteínas, grasas, hidratos de carbono, vitaminas, minerales y fibra.

1. Declaraciones distintas a las relativas a la reducción de riesgo de enfermedad y al desarrollo y salud de los niños (Art. 13).

La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (*European Food Safety Authority*, EFSA) determinó que algunas declaraciones de propiedades saludables, podían indicar una relación causa-efecto entre una categoría de alimento, un alimento o uno de sus constituyentes y el efecto declarado. Estas alegaciones deben referirse al mantenimiento o la mejora de la salud, sin hacer indicación a que eviten o disminuyan el riesgo de padecer alguna enfermedad o que ayuden a su tratamiento o curación. Para la obtención de esta declaración se posibilitan dos opciones:

- Basado en datos científicos generalmente aceptados y comprensibles por el consumidor (Art. 13.1).
- Basadas en datos científicamente obtenidos y/o incluyan una solicitud de protección de datos sujetos a derechos de propiedad industrial, pudiendo ser usadas por la empresa únicamente por periodo de 5 años (Art. 13.5).

Dichas declaraciones fueron promulgadas por la Comisión Europea como lista de declaraciones autorizadas de propiedades saludables de los alimentos distintas de las relativas a la reducción del riesgo de enfermedad y al desarrollo y la salud de los niños en el reglamento de la UE nº 432/2012, que posteriormente fue ampliada nº 536/2013, nº 851/2013 y nº 1018/2013, siendo señaladas algunas de ellas en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Ejemplos de declaraciones nutricionales y de propiedades saludables, autorizadas en base al artículo 13.1 del Reglamento (CE) 1924/2006 y de acuerdo a lo establecido en Reglamento (UE) 432/2012.

Declaración nutricional	Declaración de salud
<p><u>Fuente de ácidos grasos n-3</u></p> <p>Alimentos que contienen al menos 0,3 g de ácido α-linolénico (ALA) por 100 g y por 100 kcal o al menos 40 mg de la suma de ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosahexaenoico (DHA) por 100 g y por 100 kcal.</p>	<p>El ALA contribuye a mantener niveles normales de colesterol sanguíneo. Los ácidos EPA y DHA contribuyen al funcionamiento normal del corazón, a mantener el funcionamiento normal del cerebro y al mantenimiento de la visión en condiciones normales.</p>
<p><u>Alto contenido de ácidos grasos n-3</u></p> <p>Alimentos que contienen al menos 0,6 g de ALA por 100 g y por 100 kcal o al menos 80 mg de la suma de EPA y DHA por 100 g y por 100 kcal.</p>	<p>El ALA contribuye a mantener niveles normales de colesterol sanguíneo. Los ácidos EPA y DHA contribuyen al funcionamiento normal del corazón, a mantener el funcionamiento normal del cerebro y al mantenimiento de la visión en condiciones normales.</p>
<p><u>Alto contenido en grasas insaturadas</u></p> <p>El 70 % o más de los ácidos grasos presentes en el producto proceden de grasas insaturadas y las grasas insaturadas aportan más del 20 % del valor energético del producto.</p>	<p>La sustitución de grasas saturadas por grasas insaturadas contribuye a mantener niveles normales de colesterol sanguíneo. El ácido oleico es una grasa insaturada.</p>

2. Declaraciones de reducción del riesgo de enfermedad (Art. 14.1.a).

Estas disposiciones se centran en la actividad de un grupo muy reducido de sustancias (**Tabla 3**). Igualmente, en el etiquetado deberá indicar que “la enfermedad tiene múltiples factores de riesgo y la alteración de uno de ellos puede o no surgir efecto beneficioso”.

Tabla 3. Ejemplos de declaraciones de reducción de riesgo de enfermedad autorizada (art. 14.1a del Reglamento 1924/2006).

Compuestos	Declaración de salud	Condiciones de uso
Beta-glucanos de cebada.	Se ha demostrado que el betaglucano de cebada disminuye/reduce el colesterol sanguíneo. Una tasa elevada de colesterol constituye un factor de riesgo en el desarrollo de cardiopatías coronarias.	Debe informarse al consumidor de que el efecto beneficioso se obtiene con una ingesta diaria de 3 g de beta-glucano de cebada. La declaración puede utilizarse para alimentos que contienen al menos 1 g de beta-glucano de cebada por cada porción cuantificada.
Calcio.	El calcio contribuye a reducir la desmineralización ósea en mujeres postmenopáusicas. Una densidad mineral ósea baja es un factor de riesgo de fracturas óseas osteoporóticas.	Esta declaración solo puede utilizarse en alimentos que aporten al menos 400 mg de calcio por porción cuantificada. Se informará al consumidor de que la declaración está dirigida específicamente a las mujeres a partir de 50 años y de que el efecto beneficioso se obtiene con una ingesta diaria de al menos 1 200 mg de calcio de todas las fuentes. Para los alimentos con calcio añadido, la declaración podrá utilizarse únicamente para aquellos destinados a las mujeres a partir de 50 años.
Calcio y Vitamina D.	El calcio y la vitamina D contribuyen a reducir la desmineralización ósea en mujeres postmenopáusicas. Una densidad mineral ósea baja es un factor de riesgo de fracturas óseas osteoporóticas.	La declaración solo puede utilizarse en complementos alimenticios que aporten al menos 400 mg de calcio y 15 µg de vitamina D por porción diaria. Se informará al consumidor de que la declaración está dirigida específicamente a las mujeres a partir de 50 años y de que el efecto beneficioso se obtiene con una ingesta diaria de al menos 1200 mg de calcio y 20 µg de vitamina D de todas las fuentes. Para los complementos alimenticios con calcio y vitamina D añadidos, la declaración podrá utilizarse únicamente para aquellos destinados a las mujeres a partir de 50 años.
Vitamina D.	La vitamina D contribuye a reducir el riesgo de caídas relacionado con la inestabilidad postural y con la debilidad muscular. Las caídas constituyen un factor de riesgo de fracturas óseas en hombres y mujeres a partir de 60 años.	La declaración solo puede utilizarse en complementos alimenticios que aporten al menos 15 µg de vitamina D por porción diaria. Se informará al consumidor de que el efecto beneficioso se obtiene con una ingesta diaria de 20 µg de vitamina D de todas las fuentes. Para los complementos alimenticios con vitamina D añadida, la declaración podrá utilizarse únicamente para aquellos destinados a hombres y mujeres a partir de 60 años.
Ácido fólico.	Una ingesta suplementaria de ácido fólico incrementa el nivel de folato materno. Una cantidad baja de folato materno es un factor de riesgo de defectos del tubo neural en el feto en desarrollo.	La declaración solo puede utilizarse en complementos alimenticios que aporten una ingesta diaria de al menos 400 µg de ácido fólico. Se informará al consumidor de que la población destinataria son mujeres en edad de procrear y que el efecto beneficioso se obtiene con una ingesta diaria suplementaria de ácido fólico de 400 µg durante al menos un mes antes de la concepción y hasta tres meses después de esta.
Ácidos grasos monoinsaturados (AGM) y/o poliinsaturados (AGP).	Se ha demostrado que la sustitución de grasas saturadas por grasas insaturadas en la dieta disminuye/reduce el colesterol en la sangre. Una tasa elevada de colesterol constituye un factor de riesgo de cardiopatías coronarias.	Esta declaración solo puede utilizarse en alimentos con alto contenido de ácidos grasos insaturados, de acuerdo con la declaración ALTO CONTENIDO DE GRASAS INSATURADAS que figura en el anexo del Reglamento (CE) no 1924/2006. La declaración solo puede usarse en grasas y aceites.

3. Declaraciones relativas al desarrollo y salud de los niños (Art. 14.1.b).

Estas alegaciones podrán efectuarse si se demuestran científicamente su actuación específica en los niños. Deben realizarse estudios específicos para este grupo de población y por tanto, no se podrán usar alegaciones realizadas para la población adulta (**Tabla 4**).

Tabla 4. Ejemplo de declaraciones saludables autorizadas relativas al desarrollo y salud de los niños (art. 14.1b del Reglamento 1924/2006).

Compuestos	Declaración de salud	Condiciones de uso
Ácido α -linolénico (ALA) y ácido linoleico (LA), ácidos grasos esenciales.	Los ácidos grasos esenciales son necesarios para el crecimiento y el desarrollo normales de los niños.	Información al consumidor de que el efecto beneficioso se obtiene con una ingesta diaria de 2 gramos de ácido ALA y una ingesta diaria de 10 gramos de LA.
Ácido docosahexaenoico.	Contribuye al desarrollo visual normal de los niños hasta los 12 meses de edad.	Se informará al consumidor de que el efecto beneficioso se obtiene con una ingesta diaria de 100 mg de DHA. Cuando la declaración se haga con respecto a preparados de continuación, el alimento debe contener al menos un 0,3 % del total de ácidos grasos como DHA.
Ácido docosahexaenoico.	La ingesta materna de DHA contribuye al desarrollo normal de los ojos del feto y del lactante alimentado con leche materna.	Se informará a las mujeres embarazadas o en período de lactancia de que el efecto beneficioso se obtiene con una ingesta diaria de 200 mg de DHA, además de la ingesta diaria recomendada de ácidos grasos omega para los adultos, esto es, 250 mg de DHA y de ácido eicosapentaenoico (EPA). La declaración puede ser utilizada solamente para aquellos alimentos que aporten una ingesta diaria de al menos 200 mg de DHA.
Proteínas.	Las proteínas son necesarias para el crecimiento y el desarrollo normales de los huesos en los niños.	Esta declaración solo puede utilizarse en relación con alimentos que son, como mínimo, fuente de proteínas de acuerdo con la declaración <i>fuentes de proteínas</i> que figura en el anexo del Reglamento (CE) no 1924/2006 .

Muchas de las alegaciones descritas anteriormente son susceptibles de ser empleadas en alimentos constituidos por matrices cárnicas, dada la excepcional aptitud que muestran estos productos para optimizar su composición en relación con la presencia de compuestos con implicación positivas y negativas para la salud de los consumidores (Jiménez-Colmenero et al., 2001; Decker y Park, 2010).

1.2. CARNE Y PRODUCTOS CÁRNICOS EN EL MARCO DE LA ALIMENTACIÓN FUNCIONAL. IMPORTANCIA EN EUROPA Y ESPAÑA

La carne es uno de los alimentos básicos en la dieta. Su consumo se ha incrementado a lo largo de décadas debido entre otras cosas, al aumento del poder adquisitivo de la población y al abaratamiento de los costes de producción a partir de la revolución industrial.

La industria agroalimentaria ocupa el primer puesto a nivel económico en el sistema productivo español y europeo, representando cerca del 15% de la facturación (INE, 2015; Food Drink, 2016), con un valor superior a los 1.089 billones de euros en facturación en Europa en 2015, viéndose incrementado con respecto al año 2014 (Food Drink, 2016). Dicha industria en España se sitúa en el 5º puesto en producción detrás de Alemania, Francia, Italia y Reino Unido. Así mismo, el sector cárnico en España ocupa el primer lugar dentro de las IA y, según los últimos datos, la facturación se encuentra en torno a 20.000 millones de euros, representando casi el 20% del total del sector alimentario (INE, 2015).

Los españoles destinan a la compra de carne y derivados un 20,95% del presupuesto, situándose su consumo en el hogar en alrededor de 50,13 kg/persona/año (MAPAMA, 2016a). De estos alimentos, el 74% se comercializó en forma de carne fresca, un 23,5% como carne transformada y el resto 2,5% como congelada. El consumo de carne procesada fue cerca del 8,23 kg/persona/año, siendo el fiambre el producto más consumido en los hogares españoles (7,36%), seguida de jamón/paleta curada, jamón cocido, chorizo y fuet/longaniza (**Figura 2**). Según datos del MAPAMA, el perfil de hogar con mayor volumen de compra de estos alimentos, es el formado por pareja joven y pareja adulta con o sin hijos de clase media o media-alta.

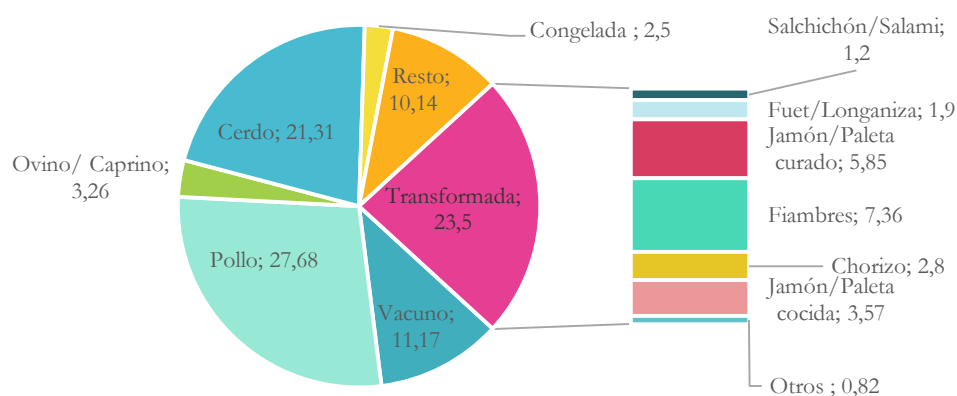


Figura 2. Distribución (%) de consumo de los diferentes tipos de carne en los hogares españoles (MAPAMA, 2016b).

1.2.1. Importancia de los nutrientes de la carne y su implicación en la salud

Actualmente la industria cárnica, al igual que otras áreas de la alimentación, se encuentra inmersa en continuos procesos de transformación principalmente debido a la demanda de los consumidores de alimentos más seguros y saludables. Así pues, los consumidores están más concienciados ante las posibles implicaciones en la salud que puede conllevar el consumo de alimentos y en particular de la carne y sus derivados. Recientemente, esta idea se ha visto fortalecida, entre otras razones, por las publicaciones de la OMS (2013) y otras organizaciones que han señalado una relación directa entre el consumo de carne y sus derivados con el desarrollo de diversas enfermedades crónicas como el sobrepeso-obesidad, trastornos cardiovasculares, y algunos tipos de cánceres como el de colón (Fung et al., 2004; Chao et al., 2005; Cross et al., 2007; McAfee et al., 2010). Sin embargo, conviene no olvidar que, desde el punto de vista nutricional, la carne es un alimento esencial en la dieta dado que aporta un gran número de nutrientes de alto valor biológico y de elevada disponibilidad (Olmedilla-Alonso y Jiménez-Colmenero, 2014).

1.2.1.1. Componentes mayoritarios de la carne

La carne y los productos cárnicos son generalmente reconocidos como alimentos altamente nutritivos que aportan concentraciones valiosas de nutrientes y micronutrientes (OMS, 2003). Los hábitos alimentarios muestran un aumento en la tendencia del consumo de carne, siendo más alto en los países industrializados (WCR/AICR, 2007). La carne y productos cárnicos por su composición y elevado consumo constituyen una fuente importante de un amplio número de nutrientes esenciales para un crecimiento y desarrollo óptimos, aportando proporciones considerables de su ingesta dietética (Jiménez-Colmenero et al., 2012) (**Tabla 5**).

1.2.1.1.1. Proteínas, péptidos y aminoácidos

La carne y derivados son una de las principales fuentes de proteínas de alto valor biológico de la dieta. Habitualmente la concentración de proteína en estos productos se encuentra entre el 13-25% (**Tabla 5**). La composición de las proteínas de origen animal es más parecida a la del organismo humano y, por tanto, en general, tendrá una mayor calidad nutricional. Además, presenta un gran porcentaje de aminoácidos esenciales (40%) entre ellos: lisina, isoleucina, treonina, valina, leucina, metionina, fenilalanina, histidina y triptófano.

La carne contiene también péptidos, algunos de cuales han mostrado beneficios sobre la salud. Este es el caso de la carnosina (β -alanil-1-histidina) y la anserina (N- β -alanil-1-metil-l-histidina) que presentan actividad antioxidante y efecto protector frente al estrés oxidativo (Hipkiss y Brownson, 2000). Además se han demostrado, principalmente en el caso de la carnosina, efectos asociados a la disminución de la presión arterial e isquemia (Fujii et al., 2003), así como un rol protector frente a la diabetes por su habilidad de controlar el índice glucémico (Lee et al., 2005). De igual modo, se ha relacionado la carnosina con actividades inhibitoras del crecimiento de células tumorales en tejidos “*in vivo*” y murinos (Boldyrev et al., 2013). Por otro, la L-carnitina (amina derivada de la lisina y metionina), compuesto también presente en la carne, está vinculada con algunas funciones biológicas como la disminución de los niveles de colesterol (Seccombe et al., 1987; Shimura y Hasegawa, 1993).

Tabla 5. Composición de la carne de vacuno y cerdo y de algunos productos cárnicos, expresada por 100 g de producto.

	Vacuno	Cerdo	Salchichas (tipo frankfurt)	Paté	Hamburguesas
Energía (kcal)	110	131	288	339	244
Proteína (g)	20	21	13	14	15
Grasa (g)	3,0	5,1	26,0	29,5	20,5
AGS	1,3	2,0	9,3	10,5	8,2
AGM	1,3	2,4	12,0	12,4	9,3
AGP	0,30	0,50	2,96	3,59	1,83
Colesterol (mg)	73	72	65	255	59
Vitaminas					
Niacina B ₃ (mg)	6,8	4,3	2,4	7,1	6,5
Riboflavina B ₂ (mg)	0,25	0,26	0,20	0,85	0,20
Tiamina B ₁ (mg)	1,00	1,00	0,30	0,18	0,04
Piridoxina B ₆ (mg)	0,45	0,45	0,10	0,35	0,27
Ácido Fólico B ₉ (μg)	11,1	4,0	3,0	99,0	12,0
Cobalamina B ₁₂ (μg)	1,6	0,7	0,5	12,0	1,0
Minerales					
Fe (mg)	1,7	1,2	1,0	5,5	2,5
Zn (mg)	3,1	1,6	1,4	2,3	3,2
Se (μg)	8,7	14,0	8,3	41,6	23,0
Na (mg)	61	53	900	738	600
K (mg)	328	420	170	173	270

AGS: Ácidos grasos saturados; AGM: ácidos grasos monoinsaturados; AGP: Ácidos grasos poliinsaturados. BEDCA (2010).

Adicionalmente, las proteínas cárnicas pueden originar péptidos bioactivos (Arihara, 2006; Mulero et al., 2011). Dichos péptidos, de 2 a 20 aminoácidos, pueden ser formados por hidrólisis enzimática o químicamente durante la elaboración, conservación de los alimentos o en la digestión gastrointestinal (Mulero et al., 2011; Ryan et al., 2011). Concretamente, en la carne y productos cárnicos se han detectado una gran variedad de ellos. Dentro de las distintas actividades que estos péptidos pueden tener en el organismo, cabe señalar los péptidos inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (ECA) (Ryan et al., 2011), cuyos efectos antihipertensivos están siendo muy estudiados (Arihara, 2006; Escudero et al., 2012a; Escudero et al., 2012b; Escudero et al., 2013). Por otro lado, Saiga et al. (2003) describieron cinco péptidos con capacidad antioxidante frente a la oxidación del ácido linoleico tras someter a la carne de cerdo a una proteólisis con papaína y actinasa E. Así mismo, Escudero et al. (2012a) detectaron péptidos con una actividad antioxidante similar en productos crudo-curados como el chorizo. Además, se ha descrito la formación de péptidos biológicamente activos con afinidad por receptores opiáceos a partir de la hemoglobina y se ha señalado la posible presencia de estos péptidos en productos cárnicos con alto contenido en sangre, como por ejemplo la morcilla (Arihara, 2006).

Es importante señalar que según las recomendaciones de las OMS, las proteínas deben aportar entre un 10-15% de la energía total (OMS, 2003). También es necesario mencionar que el consumo de proteína cárnica ejerce un papel relevante en el crecimiento, regeneración de tejidos, etc. A su vez, la ingesta de proteínas cárnicas se relaciona con un efecto saciante y por tanto su consumo moderado puede ayudar a mantener el peso y reducir el riesgo cardiovascular (Layman et al., 2008; Paddon-Jones et al., 2008).

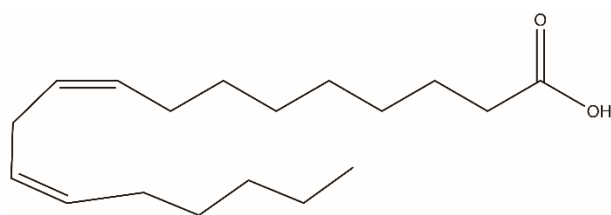
1.2.1.1.2. Lípidos

En el caso de la carne y los productos cárnicos, el porcentaje de lípidos puede variar dependiendo de numerosos factores: tipo de producto, formulación, procesado, etc. Es por ello que estos alimentos pueden presentar niveles que varían desde un 3% de lípidos en la carne magra hasta más de un 60% en embutidos o *bacon* (**Tabla 5**).

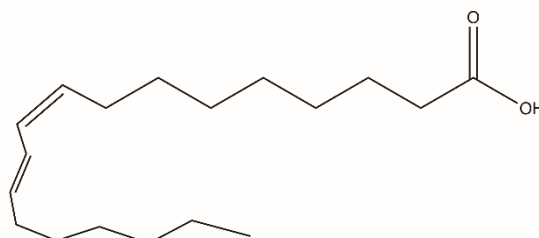
La grasa está compuesta mayoritariamente por triglicéridos, moléculas formadas por AG unidos a un glicerol a través de enlaces éster. También están acompañados, en cantidades minoritarias de fosfolípidos, esteroides (colesterol) e isoprenoides. Todo lo cual proporciona al organismo compuestos necesarios para un buen funcionamiento.

Según el número de dobles enlaces los AG se clasifican como: AGS cuando no contienen ningún doble enlace, AGM cuando contiene un doble enlace, y AGP si presentan dos o más dobles enlaces. Dentro de estos últimos, los ácidos grasos de la serie n-3 u omega-3 y su precursor el ácido alfa-linolénico y los ácidos grasos de la serie n-6 u omega-6 y su precursor el ácido linoleico son de gran importancia en el desarrollo de distintas funciones biológicas. El cuerpo humano necesita estos dos precursores para poder formar los distintos ácidos grasos de cada serie si bien hay que tener en cuenta que nuestro organismo no es capaz de sintetizar en abundancia los distintos ácidos grasos provenientes de estos (Burdge, 2006).

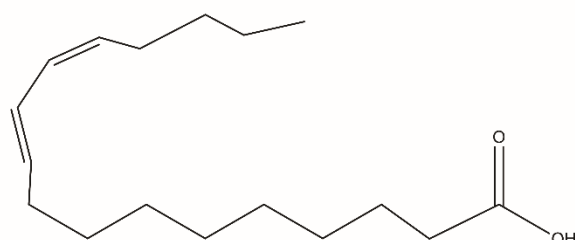
Según la posición del hidrógeno a los carbonos adyacentes al del doble enlace, los AG se clasifican como *cis* o *trans*. Los *cis* presentan los hidrógenos del doble enlace en la misma posición, mientras los *trans* presentan los hidrógenos en oposición. Estos últimos no son sintetizados por el organismo humano, por lo que solo pueden ser obtenidos mediante la ingesta de alimentos que los porten. Aunque no se conoce su función en el organismo, estos, de forma general, se asocian con las enfermedades coronarias (EFSA, 2010). No obstante, cabe mencionar que en la carne hay compuestos lipídicos con enlaces *trans* de gran importancia como el conjunto de isómeros naturales del ácido linoleico conocido como **ácido linoleico conjugado (CLA)**. Estos presentan concentraciones que varían entre el 0,2-1,0 g/100g en músculo de ternera (Raes et al., 2004), siendo el mayoritario en la naturaleza el ácido ruménico que muestra los dobles enlaces en la posición 9-*cis* y 11-*trans* (**Figura 3**). A este tipo de AG se les ha atribuido distintos efectos en el organismo entre ellos la reducción de grasa y el aumento de la masa muscular (Whigham et al., 2007), así como la disminución de glucosa en sangre (Belury, 2002a; Fuke y Nornberg, 2017). Se han demostrado que estos compuestos presentan efectos anticarcinogénicos y antiaterogénicos tanto en estudios *in vivo*, como en estudios epidemiológicos de cohortes en humanos (Knekt et al., 1996; Aro et al., 2000; Belury, 2002b; Lim et al., 2005).



Ácido 9 cis,12 cis-octadecadienoico (ácido linoleico)



ácido 9 cis, 11 trans octadecadienoico (ácido ruménico)



ácido 10 trans, 12 cis heptadecadienoico

Figura 3. Ácido linoleico e isómeros más abundantes de ácido linoleico conjugado.

Otro de los compuestos de gran relevancia es **el colesterol** que presenta valores entre 58-110 g/100 g (**Tabla 5**), salvo excepciones como vísceras, etc., siendo las recomendaciones de ingesta de un máximo de 300 mg/día (OMS, 2003). El colesterol es un esteroide que se encuentra en alimentos de origen animal, siendo un componente esencial de las membranas plasmáticas. Este desempeña diversas funciones vitales en el organismo. El colesterol que circula por el torrente sanguíneo está en forma de éster de colesterol y por tanto no es soluble en agua. Así pues, su transporte está asociado a otros compuestos como algunas proteínas y fosfolípidos (Nelson et al., 2008). Dependiendo de las moléculas a las que se agregue dará lugar a distintas lipoproteínas, entre ellas las lipoproteínas de alta densidad (*high density lipoprotein*, HDL) y las lipoproteínas de baja densidad (*low density lipoprotein*, LDL). Cuando los niveles de colesterol en LDL llegan a ser elevados pueden depositarse en las paredes de las arterias, constituyendo un factor de riesgo relacionado con las ECV. Por contra, las concentraciones elevadas de colesterol en HDL están asociadas con la movilización del colesterol hacia el hígado, presentando a su vez propiedades antiaterogénicas (Tall, 1998).

La OMS (2013) recomienda que las kcal provenientes de la grasa se encuentren entre el 20-35% del total de la dieta, siendo los productos cárnicos una de sus principales fuentes (**Tabla 6**). Igualmente, también se han establecido recomendaciones acerca de la relación y el tipo de AG que deben ser aportados en la misma (OMS, 2013). De esta manera, la energía aportada por los ácidos grasos saturados debe constituir menos del 10%, los ácidos grasos poliinsaturados (AGP) entre el 6-11% y los ácidos grasos monoinsaturados (AGM) por diferencia.

Es importante mencionar que, en la carne, los AGS componen entre un 30-40% del total (**Tabla 5**). Dentro de este grupo se encuentran mayoritariamente el ácido palmítico (C16:0), ácido esteárico (C18:0) y ácido mirístico (C14:0). Los AGM representan en torno al 40-50%, siendo el más abundante el ácido oleico (18:1 n-9) con un 20-47%, seguido del ácido palmitoleico (C16:1) y del ácido vaccénico (C18:1 n-7). Sin embargo, los AGP se encuentran en cantidades muy pequeñas 0,3-3%, entre ellos destacan los ácidos grasos esenciales: ácido linoleico (C18:2 n-6, LA) y el ácido α -linolénico (C18:3 n-3, ALA). La carne contiene cantidades relativamente pequeñas de AGP n-3 de cadena larga como el ácido eicosapentaenoico (20:5 n-3, EPA) y el ácido docosahexaenoico (22:6 n-3; DHA), aunque en dietas pobres en pescados, la carne y los huevos constituyen posiblemente la fuente más importante de EPA y DHA (Brenna et al., 2009; Welch et al., 2010).

Desde hace décadas, se está describiendo el destacado papel que ejercen las grasas en las distintas funciones del organismos, como es el caso por ejemplo de la modulación de numerosas funciones génicas y estructurales (Sánchez-Muniz y Nus, 2008). Pero también se ha demostrado su implicación en el desarrollo de enfermedades, entre ellas las cardiovasculares, condicionada tanto por factores asociados a la cantidad de grasa como al tipo de ácido graso que la compone (EFSA, 2010).

1.2.1.2. Componentes minoritarios de la carne

La carne es un alimento de gran importancia nutricional debido a la presencia de algunos micronutrientes primordiales para el buen desarrollo psicomotor y cognitivo tanto de adultos como de niños (Biesalski, 2005). Como se observa en la **Tabla 6**, la carne aporta una gran proporción de las cantidades ingeridas diariamente de muchos micronutrientes.

Tabla 6. Perfil nutricional de la dieta española media y su relación con el consumo de carne y derivados. Adaptado de MSSI/AESAN (2012).

Nutrientes	Ingesta total/ día	Nutrientes aportados por la carne	Contribución (%) de la carne a la ingesta
Energía (kcal)	2293	390	17
Proteína (g)	96,7	27,6	28,0
Grasa (g)	221,2	61,8	28,0
AGS	29,2	8,5	29,0
AGM	43,6	9,2	21,0
AGP	14,1	2,3	16,0
Colesterol (mg)	380	65	17
Vitaminas			
Niacina B ₃ (mg)	42,5	9,4	22,0
Riboflavina B ₂ (mg)	1,25	0,23	15,0
Tiamina B ₁ (mg)	1,9	0,4	21,0
Piridoxina B ₆ (mg)	1,8	0,4	23,0
Ácido Fólico B ₉ (μg)	281,0	14,1	5,0
Cobalamina B ₁₂ (μg)	7,0	1,0	15,0
Minerales			
Fe (mg)	14,9	2,4	16,0
Zn (mg)	9,6	2,5	26,0
Se (μg)	58,6	9,4	16,0
Na (mg)	2526	530	21
K (mg)	3951	514	13
P (mg)	1392	251	18
Mg (mg)	375	34	9

1.2.1.2.1. Vitaminas

Las vitaminas son micronutrientes esenciales que han de ser aportadas a través de la dieta puesto que la mayoría de ellas no son sintetizadas por el organismo.

La carne y sus derivados proporcionan un alto porcentaje de las vitaminas, llegando a contribuciones superiores al 20% del total de la dieta (**Tabla 6**). En el caso de la vitamina **B₁₂**, **B₆** y **ácido fólico** la carne y derivados representan una de las fuentes más importantes y naturales junto con otros alimentos de origen animal como el pescado y los huevos. La deficiencia de

riboflavina, presente en la carne, puede ser asociada con la aparición de enfermedades como el cáncer y la diabetes. La carencia de las vitaminas **B₆** y **ácido fólico** desencadenan la anemia macrocítica, así como el déficit de ácido fólico durante el desarrollo fetal ocasiona defectos del cierre del tubo neuronal. La escasez severa de vitamina **B₁₂**, muy presente en las carne y deficitaria en dietas vegetarianas sin suplementación, se asocia con anemia megaloblástica, neuropatías y acumulación de homocisteína, compuesto que en cantidades elevadas en el torrente sanguíneo se considera factor de riesgo de enfermedades cardiovasculares (ECV) (Gil, 2010).

1.2.1.2.2. Minerales

La carne y sus derivados son una fuente primordial de **Fe**, **Zn** y **P**, además de aportar cantidades significativas de **Se**, **Mg** y **K** (**Tabla 6**). Particularmente, los productos cárnicos pueden llegar a aportar hasta el 16% del **Fe** del ingerido en la dieta, siendo su consumo muy determinante para evitar la deficiencia del mismo. Su biodisponibilidad, es mayor en productos de origen animal y además carecen de fitatos que sí están presentes en los de origen vegetal (Rubio et al., 2007). Se estima que el 30 y el 40% de la población de los países industrializados y en desarrollo, respectivamente, presenta deficiencia en hierro (OMS, 2015). Esto supone un problema a nivel mundial, ya que gran parte de la población sufre carencia de este oligoelemento, además de inducir la anemia ferropénica.

La carne es la mayor fuente de **Zn** (**Tabla 6**) dado que su aporte supone hasta el 26% de la ingesta diaria (Rubio et al., 2007). Al igual que el **Fe**, presenta una gran biodisponibilidad en alimentos de origen animal. Además, la carne también aporta un alto porcentaje de **P** (18%) como se observa en la **Tabla 6**. Llegar a las ingestas recomendadas de ambos minerales es importante ya que esta contribuye a regular la expresión genética, la síntesis de proteínas, así como el crecimiento celular y su diferenciación (Gil, 2010).

Otro mineral con gran importancia en los productos cárnicos es el **Se** el cual forma parte de la enzima glutathion peroxidasa. Su déficit puede ocasionar la enfermedad de Keshan y otras asociadas con la función inmune, la infección viral, la reproducción y el comportamiento (EFSA, 2014). La concentración de **Na** en la carne es baja, próximas a 50 mg/100 g, no obstante en los productos cárnicos este puede llegar a ser muy elevadas con valores de hasta 900 mg/100 g o incluso superior (**Tabla 5**). Así que, dependiendo de los productos cárnicos que se consuman, su presencia puede constituir un factor de riesgo de hipertensión y de ECV. El **K** es un mineral de acción complementaria con el **Na** en las células (bomba sodio-potasio), por tanto, mantener el equilibrio de la relación Na/K es importante. Se ha descrito que las ingestas superiores a 3500

mg/día de K genera efecto protector frente a patologías cardiovasculares y presión arterial (EFSA, 2016).

1.2.2. Componentes de la carne y relación con enfermedades crónicas no transmisibles (ENT)

Como se señaló en el Apartado 1.1 la principal causa de muerte en la población europea son las ENT entre las que se encuentran el cáncer, obesidad, síndrome metabólico, ECV y diabetes. En este sentido, la OMS ha informado recientemente de una relación directa entre ciertos constituyentes, algunos de los cuales pueden aparecer durante la transformación y preparación culinaria de la carne roja y procesada, y la aparición de ciertos **tipos de cáncer** como el de colon, páncreas y próstata (Willett et al., 1990; Giovannucci et al., 1994; Norat et al., 2002; Chao et al., 2005; Larsson y Wolk, 2006; Cross et al., 2007; CIIC, 2015). Sin embargo, hay cierta controversia entre la comunidad científica ya que algunos autores como McAfee et al. (2010) y Alexander et al. (2011) argumentan que dichas evidencias no son completamente consistentes, debido, entre otras causas, a la heterogeneidad de los estudios y los distintos patrones dietéticos de la población. No obstante, no se debe olvidar que la propia OMS, ha declarado que la carne roja tiene un “importante papel nutricional” y que la evidencia de que su consumo cause cáncer de colon es aún limitada (CIIC, 2015).

También se ha evidenciado una relación positiva entre el consumo de productos cárnicos transformados con un mayor índice de peso corporal (Vang et al., 2008; Wang y Beydoun, 2009; Rouhani et al., 2014), si bien algunos autores no han podido demostrar dicha relación entre el consumo de carne y la obesidad (Wyness et al., 2011; Wyness, 2016). Distintos estudios han descrito una interacción positiva entre el sobrepeso u obesidad y la probabilidad de padecer diabetes, hipertensión, cardiopatía coronaria, accidente cerebrovascular y ciertos tipos de cáncer (DeFronzo y Ferrannini, 1991; OECD/EU, 2016).

Otra de las asociaciones negativas del consumo de carne con la salud es el **síndrome metabólico** (Babio et al., 2010). Dicha patología conlleva asociado un aumento del riesgo de padecer diabetes y ECV. Algunos autores han puesto de manifiesto la relación entre la **diabetes** y el consumo de elaborados cárnicos (Fung et al., 2004; Azadbakht y Esmailzadeh, 2009; Kouvari et al., 2016). También se ha demostrado la vinculación del consumo de carne con las **ECV** (Steffen et al., 2005; Micha et al., 2010). No obstante, Wyness et al. (2011) concluye que la relación entre la diabetes,

ECV y la carne debe ser analizada con cautela, ya que muchos estudios no han diferenciado y especificado las distintas ingestas, tipos y composición de los productos cárnicos.

Como consecuencia de todo lo expuesto resulta conveniente realizar una breve exposición de algunos de sus constituyentes que, como el colesterol, la sal (sodio), los nitritos y los distintos tipos de ácidos grasos pueden afectar a la salud del consumidor:

La **sal** y por ende el sodio puede llegar a encontrarse presente en cantidades elevadas en los derivados cárnicos (**Tabla 5**). Como se ha descrito previamente la ingesta elevada de sodio provoca un aumento de la presión arterial y se asocia con el desarrollo de ECV (Ruusunen y Puolanne, 2005). La incapacidad del riñón de eliminar el exceso de sodio ingerido en la dieta, es actualmente la hipótesis más aceptada del efecto del sodio sobre la hipertensión arterial (Campese, 1994). Es por ello que desde distintos ámbitos se ha recomendado disminuir su consumo en personas con riesgo de hipertensión y como complemento a la medicación anti-hipertensiva (Kotchen y McCarron, 1998; OMS, 2003). Así mismo, existe una clara relación entre el consumo de carne procesada e hipertensión, debido fundamentalmente a la cantidad de sal añadida y posiblemente también al uso de sales nitrificantes sódicas durante su procesado (Micha et al., 2010).

Las **aminas heterocíclicas, hidrocarburos aromáticos policíclicos y n-nitrosocompuestos** son algunos de los compuestos que se han asociado con el desarrollo de cáncer colorrectal y síndrome metabólico (Cross et al., 2007; Babio et al., 2010). Los n-nitrosocompuestos se forman por la reacción del nitrito y óxidos de nitrógeno con aminas secundarias y n-alquilamidas, presentes en ciertas carnes procesadas, además de poderse generar de manera endógena, tras el consumo de carne roja y procesada, en el intestino (Santarelli et al., 2008; Santarelli et al., 2010). Bouvard et al. (2015) han indicado que un consumo superior de 50 g de carne procesada y 100 g de carne roja al día podría aumentar entre un 18% y un 17% la probabilidad de padecer cáncer de colon.

En relación a la ingesta de lípidos, se ha descrito que algunos individuos pueden presentar una mayor sensibilidad que otros al **colesterol dietético**, desarrollando por tanto hipercolesterolemia (Howell et al., 1997). Así mismo, se han relacionado los **AGS** de la dieta con el aumento de colesterol total en sangre, tanto en la fracción LDL como en la HDL (Hegsted et al., 1965; Keys y Parlin, 1966). No obstante, existe una gran controversia en cuanto al papel de los AGS en el metabolismo lipídico. En este sentido, distintos estudios han demostrado que el tipo de AGS es determinante; particularmente el láurico, mirístico y palmítico han sido relacionados con un aumento en sangre del colesterol total y LDL-colesterol (Temme et al., 1996; Kris-Etherton y Yu, 1997). Sin embargo, la ingesta de ácido esteárico no ha sido relacionada con un aumento del

colesterol ligado a las LDL. Por ello, el ácido esteárico junto con los AG de cadena corta (menos de diez átomos de carbono) han sido denominados como ácidos grasos neutros frente al metabolismo lipídico (Bonanome y Grundy, 1988; Yu et al., 1995; Kris-Etherton y Yu, 1997). En cambio, otros autores han demostrado una relación positiva de los AG: láurico, mirístico esteárico y palmítico con las muertes producidas por ECV (Kromhout et al., 1995; Aspelund et al., 2010). Además, algunos autores han relacionado la ingesta elevada de AGS y ácidos grasos *trans* con la aparición de la diabetes (Hu et al., 2001; Riserus et al., 2009). Recientemente, un meta-análisis ha señalado que la reducción de AGS no siempre es beneficiosa y protectora frente enfermedades crónicas como las ECV y cáncer de mama (Siri-Tarino et al., 2010). En esta línea, Gardner y Kraemer (1995) no observaron modificaciones de la concentración de HDL, LDL y triglicéridos en sangre al introducir aceites ricos en AGM y AGP en la dieta. Sin embargo, otros estudios sí han encontrado efecto protector de la dieta rica en ácido oleico (C18:1 n-9), típico de la *dieta mediterránea*, a la que se asocia un descenso de los niveles de colesterol ligado a las LDL y del colesterol total en sangre (Kris-Etherton y Nutrition, 1999; Estruch et al., 2013).

Así mismo, en las últimas décadas, las investigaciones llevadas a cabo relativas a la sustitución de los AGS por los ácidos grasos polinsaturados han sido muy numerosas. Algunos estudios establecen efectos positivos de los AGP n-6 sobre la salud, ya que disminuye el colesterol LDL (Howard et al., 1995). En el caso de los AGP n-3 se han descrito efectos saludables sobre el organismo dado que su sustitución por los AGS conducen a una menor aparición de enfermedades crónicas (Nordoy et al., 2001; EFSA, 2011). Entre dichos tipos de AGP n-3 se encuentran el ALA que se halla en las semillas y aceites de lino, chía, perilla, etc., y los AGP de cadena larga como EPA y DHA presentes en el pescado y algas, a todos los cuales se les atribuye efecto beneficioso (Nordoy et al., 2001). No obstante se ha demostrado que los ácidos grasos de origen marino además tienen mayor efecto protector frente a ECV, ayudando a mantener el normal funcionamiento del cerebro y la visión (Wang et al., 2006; EFSA, 2010).

Además de las consideraciones individuales por cada tipo de ácido graso, existen evidencias científicas que demuestran que una dieta con una relación adecuada entre los AGP/AGS (recomendada $> 0,4$) y AGP *n-6/n-3* (recomendada <4) son factores determinantes en el bienestar y la salud de los humanos (Wood et al., 2004; Jiménez-Colmenero, 2007). A este respecto, cabe mencionar que los productos cárnicos se encuentran por lo general alejados de las recomendaciones dietéticas establecidas tanto por los que se refieren a los aspectos cuantitativos (cantidad de grasa) como a los cualitativos (perfil AG) (Olmedilla-Alonso y Jiménez-Colmenero, 2014). Por consiguiente, la modificación del contenido lipídico de los productos cárnicos por

medio de diferentes estrategias (Jiménez-Colmenero et al., 2001; Jimenez-Colmenero, 2007; Jiménez-Colmenero, 2007) y la disminución de los niveles de sodio añadidos pueden ser, entre otras posibilidades, herramientas muy versátiles para obtener alimentos más acordes con las pautas nutricionales recomendadas actualmente y ello sin generar cambios en los hábitos alimentarios de la población (Jiménez-Colmenero et al., 2001; Olmedilla-Alonso et al., 2004; Jiménez-Colmenero, 2007; Decker y Park, 2010; Jiménez-Colmenero et al., 2012).

1.3. ESTRATEGIAS DE OBTENCIÓN DE PRODUCTOS CÁRNICOS MÁS SALUDABLES

Como consecuencia de lo descrito anteriormente se plantea la necesidad de disponer de diferentes estrategias capaces de originar productos cárnicos más saludables. Dichas estrategias pueden ser enfocadas desde distintos puntos de vista, pudiéndose clasificar en dos grandes grupos. La primera de estas estrategias estaría asociada a **las prácticas de producción animal** (genéticas y nutricionales) las cuales brindan oportunidades atractivas para modificar los niveles de distintos biocomponentes. Los esfuerzos en estas iniciativas se han focalizado principalmente en la disminución del contenido de grasa y en el aumento de los AG insaturados, tanto mono como poli-insaturados, a través del empleo de prácticas de producción animal. Además, se ha aprovechado el uso de marcadores genéticos para mejorar las estrategias de selección y el entrecruzamiento del ganado para obtener por ejemplo una canal con menor contenido en grasa (Olmedilla-Alonso et al., 2013).

A pesar de estos avances, las estrategias basadas en la **reformulación en los derivados cárnicos** son las más eficientes a la hora de diseñar productos cárnicos más saludables ya que inciden directamente en la composición del producto final (Jiménez-Colmenero, 2007; Grasso et al., 2014). Existen distintas posibilidades reales de modificación dependiendo de factores tales como el nivel de grasa, la naturaleza del producto a modificar, el tipo de procesado para su elaboración, ingredientes empleados, etc. (Jiménez-Colmenero et al., 2001).

Estas estrategias pueden abarcar distintas acciones, desarrollándose numerosos y versátiles procesos de reformulación (Jiménez-Colmenero et al., 2001; Weiss et al., 2010; Jiménez-Colmenero et al., 2012; Olmedilla-Alonso et al., 2013). A título de ejemplo se pueden señalar algunas posibilidades:

- **Incorporación de minerales, vitaminas y antioxidantes o ingredientes complejos que contengan también compuestos saludables:** hierro, calcio, etc., ácido fólico, vitamina B₂ o antioxidantes procedentes de frutos como la uva, madroño, algarrobo, etc. de diversas plantas y especias como el té, romero, clavo, etc., o incorporación de nueces, algas, etc. (Bastida et al., 2009; Haak et al., 2009; López-López et al., 2009; Kong et al., 2010).
- **Favorecer la formación de péptidos bioactivos** entre otros los inhibidores de la ECA (Arihara, 2006).
- **Adición de compuestos de prebióticos, probióticos:** por ejemplo incorporación de prebióticos como cierto tipo fibra dietética procedente de distintos extractos vegetales (Cofrades et al., 2000). También se han incorporado probióticos como *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium spp.* etc. en distintos productos cárnicos como salchichas fermentadas, salami o untables (Olmedilla-Alonso et al., 2013).
- **Disminución del contenido de sodio**, mediante la sustitución parcial o total del NaCl por otros compuestos como el cloruro de potasio, sales de calcio o magnesio, especias, etc., buscando proporcionar efectos sensoriales, tecnológicos y microbiológicos similares a las de sus productos homólogos con cloruro sódico (Guàrdia et al., 2006; López-López et al., 2009; Verma et al., 2010).
- **Reducción de la presencia de nitrito** por incorporación de compuestos alternativos que aportan similar sabor, color y seguridad, así como de otros que evitan la formación de nitrosaminas (Jiménez-Colmenero et al., 2001; Delgado-Pando et al., 2012b; Olmedilla-Alonso et al., 2013).
- **Moderar la presencia de colesterol:** se consigue fundamentalmente diluyendo las materias primas de grasa y carne magra por otros ingredientes/compuestos de origen vegetal (West et al., 1989; Arvanitoyannis et al., 2000).
- **Reducir el contenido de grasa y calorías:** generalmente se basa en la utilización de materias primas cárnicas más magras y/o de una reducción de la densidad de grasa (dilución) mediante la adición de agua y otros ingredientes (gomas, sustitutivos de grasas o carbohidratos) con poco contenido calórico (Jiménez-Colmenero et al., 2001; Jiménez-Colmenero, 2007; Jiménez Colmenero, 2013; Jiménez-Colmenero, 2013b).

- **Optimizar el perfil lipídico:** reemplazando la grasa comúnmente adicionada en la elaboración de los productos por otra más acorde con las recomendaciones dietéticas actuales (Jiménez-Colmenero et al., 2001).

Por sus notables implicaciones en la salud, elevada presencia en productos, altos niveles de ingesta y posibilidades de modificación, los lípidos se encuentran entre los componentes de los alimentos de origen cárnico que mayor atención han recibido en los últimos años. En tal sentido se han llevado a cabo importantes esfuerzos para obtener productos cárnicos más saludables y funcionales en base a la reducción del contenido en grasa y/o a la mejorar de su perfil de ácidos grasos. A continuación, se describen las estrategias más relevantes que se han ensayado para abordar su desarrollo.

1.3.1. Reducción del contenido de grasa

La grasa, como se ha expuesto anteriormente, es uno de los componentes de la carne que ha sido asociado al desarrollo de las ENT. Para reducir la cantidad de grasa en los productos elaborados se han ensayado distintas estrategias, aunque dicha reducción puede conllevar alteraciones en aspectos tecnológicos y sensoriales en el producto final (Claus y Hunt, 1991). Por tanto, para obtener un producto de calidad, la sustitución de esta grasa debe ser realizada por otros componentes que acaben confiriendo a los productos características similares a las que aporta la grasa animal (Giese, 1992; Jiménez-Colmenero, 2007).

Una de las posibles estrategias, es la sustitución de grasa por **agua**, ya que, debido a su nulo aporte calórico, se posiciona como uno de los ingredientes con más posibilidades. Sin embargo, dependiendo del nivel de sustitución se pueden originar problemas tecnológicos como la disminución de la fuerza iónica y condicionar las propiedades físico-químicas de los productos. Además, el aumento del contenido en agua dificulta su retención en el producto, provoca el ablandamiento de este, e incluso favorece un mayor secado del producto final (Claus y Hunt, 1991; Kerry y Kerry, 2011).

Otra de las alternativas es la sustitución de grasa por **proteína**, bien sea de origen animal o vegetal. Si el reemplazo se realiza solo con un aumento de la proteína, sin cambios en los niveles de humedad, se obtienen productos más secos y duros (Carballo et al., 1996). De entre las múltiples posibilidades de sustitución de grasa por proteínas no cárnicas cabe destacar el empleo de suero láctico, proteína de huevo o la proteína de soja (Jiménez-Colmenero, 1996; Gujral et al., 2002;

Brewer, 2012). Esta última podría incluso tener efectos beneficiosos para la salud como protector frente a ECV u otras enfermedades. Sin embargo, esta proteína presenta efectos alérgicos en cierto sector de la población lo cual limita sus posibilidades de uso.

Por último, cabe señalar la posibilidad de reducir el contenido lipídico a través de su sustitución por **hidratos de carbono**, principalmente almidón, pectinas, celulosa, maltodextrina, carragenatos, harina de konjac, etc. (Delgado-Pando et al., 2012a; Salcedo-Sandoval et al., 2015b). En los últimos años se han realizado avances mediante la adición de fibras dietéticas de distinto origen: guisante, trigo, avellana, soja, cereales o corteza de árboles, frutos como algarroba, nuez, aceituna, granada o algas, originando productos con características adecuadas debido a la gran capacidad de retención de agua, grasa y propiedades texturizantes. Sin embargo, en algunos casos los productos desarrollados pueden mostrar texturas más duras y, en consecuencia, conllevar a una menor aceptabilidad sensorial (López-López et al., 2009; Brewer, 2012; Mehta et al., 2015; Choi et al., 2016; Pintado et al., 2016b; Pintado et al., 2016a; Minyi y Bertram, 2017).

1.3.2. Mejora del perfil lipídico

Una de las estrategias que se presenta como más exitosa para el desarrollo de productos más saludables sería la reducción de grasa asociada a una mejora del perfil ácidos grasos. La mejora del perfil lipídico (ácidos grasos) se fundamenta en la sustitución parcial o total de la grasa animal empleado habitualmente durante la elaboración de los productos cárnicos por grasas (aceites) con una composición más en consonancia con las pautas nutricionales actuales. Por tanto, se pretende una menor proporción de AGS junto con un aumento de los AGM y AGP (incluidos $n-3$ de cadena larga) y una mejor relación AGP/AGS y AGP $n-6/n-3$. Por ende, los aceites de origen vegetal o marino, que presentan una mejor relación AGP/AGS y entre los AGP $n-6/n-3$, son ingredientes apropiados para dicha reformulación (Jiménez-Colmenero, 2007). A continuación, se describe la composición en ácidos grasos de algunos de estos tipos de lípidos nutricionalmente interesantes y se compara con la del tocino a modo de ejemplo (**Figura 4**).

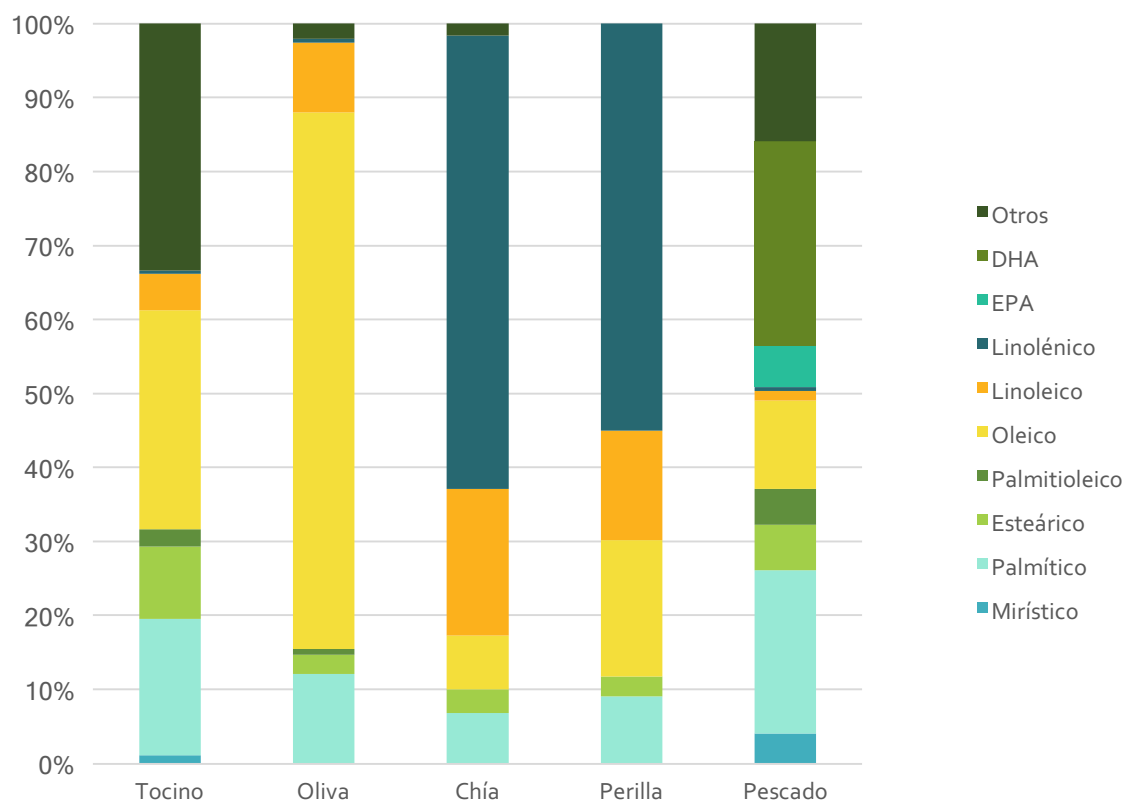


Figura 4. Perfil de ácidos grasos (g/100g) de grasa de tocino y de varios aceites (Frankel et al., 2002; Dubois et al., 2007).

1.3.2.1. Aceite de oliva

El aceite de oliva es la principal grasa de uso culinario de España, siendo fuente primordial de lípidos en la dieta mediterránea. El aceite se extrae de la oliva (*Olea europaea*) y según el método de extracción y la calidad de la aceituna se obtendrán distintos tipos de aceites de oliva aptos para el consumo humano clasificados en alguna de las siguientes categorías comerciales: oliva virgen extra, oliva virgen, oliva y de orujo de oliva. El aceite de oliva se compone mayoritariamente de triacilglicerolos (98%), mientras que el 2% restante lo constituyen más de 230 compuestos químicos, muchos de los cuales poseen capacidad antioxidante (Sánchez-Muniz, 2007). Se trata de un aceite rico en AGM (**Figura 4**) puesto que el ácido graso más abundante es el oleico, encontrándose entre el 68,0-81,5% dependiendo de la variedad de la aceituna. Entre sus componentes minoritarios destacan algunos polifenoles como tocoferol, hidroxitirosol (HXT) y oleuropeína (Bendini et al., 2007; Gunstone, 2011). Es por la presencia de estos componentes junto con el ácido oleico por lo que al aceite de oliva se le han atribuido efectos en la mejora o mantenimiento de la salud: disminución del LDL y aumento del HDL, incremento a la sensibilidad a la insulina, disminución del daño oxidativo de lípidos, etc. (Esposito et al., 2004; Bendini et al.,

2007). Por tanto, teniendo en cuenta los beneficios que reporta se ha planteado su incorporación en alimentos como el caso de los productos cárnicos (Delgado-Pando et al., 2010a; Rodríguez-Carpena et al., 2011).

1.3.2.2. Aceites de semillas de chía y perilla

Existen numerosos aceites de semillas algunos de los cuales son ricos en ácidos grasos de la serie n-9 como la colza, en n-6 como el girasol y otros ricos en ácidos grasos de la serie n-3 como por ejemplo el aceite de chía, perilla y lino. Los aceites de chía y perilla poseen un perfil lipídico similar, aunque provienen de zonas geográficas distintas. El aceite de chía se extrae de las semillas de *Salvia hispanica* L, oriunda de México y Guatemala, mientras que la perilla se obtiene de las semillas *Perilla frutescens*, cultivada en el sudeste asiático, aunque su uso culinario está muy extendido en Japón y Corea del Sur. Ambos aceites son fuente natural de AGP (**Figura 4**), concretamente en ALA (entre el 55- 60% del contenido total) siendo el aceite de chía el que muestra mayor porcentaje (60%) en este ácido graso de la serie n-3. Además, presenta niveles bajos de AGS y no contiene ningún compuesto antinutricional o factor antagonista de la vitamina B₆ (Ayerza y Coates, 2005). Estas grasas vegetales presentan también un alto porcentaje de ácido linoleico, cercano al 20%(Dubois et al., 2007). Su uso como ingrediente en la dieta puede ayudar a prevenir y tratar las ENT como las ECV, la diabetes o el cáncer, y se ha demostrado su capacidad de aumentar las HDL y reducir el colesterol en ratas (Ayerza y Coates, 2005). En el año 2009, la semilla de chía ha sido aprobada como *Novel Food* por el Parlamento europeo y el consejo de Europa, aunque solo se permite su uso en forma de semillas (EFSA, 2009).

1.3.2.3. Aceites de origen marino

Los aceites de pescado y algas son fuentes de EPA y DHA (**Figura 4**), aunque su presencia (~30%) varía según la forma de procesado y la especie de la que provenga (Simopoulos, 1991). Se ha descrito la asociación entre la ingesta de AG procedentes del consumo de pescado con una menor tasa de ECV, así como con mantenimiento normal de la función cerebral y visual (Kris-Etherton et al., 2003).

1.3.3. Sistemas de mejora del perfil lipídico en productos cárnicos

Los aceites descritos previamente presentan un perfil lipídico rico en AGM y AGP, gracias a lo cual representan una gran herramienta para la mejora del perfil lipídico en los productos cárnicos. Dichos aceites han sido incorporados en diferentes productos mediante distintos procedimientos, de manera directa tanto en forma sólida como líquida, encapsulada o como aceites emulsionados (Jiménez-Colmenero, 2007). La cantidad y la forma en que se añaden estos aceites pueden repercutir en la aceptabilidad del producto en el que se incorporan. Por tanto, es importante estudiar las distintas consecuencias que su empleo conlleva sobre las características físico-químicas del producto final.

1.3.3.1. Incorporación directa de aceites

La opción más sencilla consistiría en la sustitución de la grasa animal (sólida a temperatura ambiente) por aceites (en estado líquido a temperatura ambiente) ricos en AGP y AGM y por tanto con una menor concentración de AGS (con un elevado punto de fusión). Sin embargo, dichos aceites, además de ser más susceptibles a la oxidación, presentan unas características tecnológicas muy diferentes a las de la grasa que va a reemplazar y, por tanto, menos apropiadas para su incorporación a los productos cárnicos. No obstante, se han llevado a cabo diversos estudios en productos cárnicos en los cuales se ha realizado una incorporación directa de aceites (Lowder y Osburn, 2010; Alvarez et al., 2011; Rodríguez-Carpena et al., 2011). En otros trabajos estos han sido microinyectados en la carne para posteriormente ser usados en elaboración de productos cárnicos cocidos (Domazakies, 2005). Generalmente tales estudios evidenciaron limitaciones al incorporar estas grasas de manera directa, produciendo cambios en la textura del producto o presentando problemas de pérdida aceite, a excepción de Álvarez et al. (2011) que obtuvo la incorporación de aceite de colza en salchichas tipo frankfurt satisfactoriamente.

Dentro de las estrategias de incorporación de lípidos cabe mencionar el empleo de aceites hidrogenados. Los aceites hidrogenados mantienen el estado sólido a temperatura ambiente al aumentar su punto de fusión. Sin embargo, como consecuencia de este proceso de hidrogenación se aumenta el contenido en AGS y si la hidrogenación no es completa también se puede dar a lugar la formación de AG *trans*, que tampoco son adecuadas nutricionalmente. La interesterificación es una estrategia más interesante desde un punto de vista nutricional puesto que no se generan ácidos grasos *trans* y tampoco se produce una disminución del grado de insaturación del lípido como en el caso de la hidrogenación. La interesterificación produce la reorganización de los ácidos grasos

dentro de un triglicérido o entre moléculas de triglicéridos, pudiéndose realizar por métodos químicos o enzimáticos. Como resultado de esta reorganización de los ácidos grasos se logra aumentar el punto de fusión de los aceites. Esta metodología ha sido utilizada en la elaboración de productos cárnicos (Vural et al., 2004; Oezvural y Vural, 2008).

1.3.3.2. Incorporación de aceites encapsulados

La encapsulación de aceites constituye una de las tecnologías más útiles para la incorporación en pequeñas cantidades de estos en alimentos, así como para incrementar su protección frente a la oxidación, en especial la de aquellos que sean particularmente ricos en AGP n-3 como los aceites de pescado (Kolanowski et al., 1999). Aunque la utilización de este sistema se ha aplicado en embutidos curados (Pelser et al., 2007; Josquin et al., 2012) sus propiedades podrían no resultar adecuadas para una amplia variedad de productos cárnicos. Sin embargo su aplicación en sopas, zumos y pan está más extendida (Garg et al., 2006).

1.3.3.3. Agentes de carga

Una mención especial son los agentes de carga de aceites o “*oil bulking agents*”. Estos agentes son una alternativa para estabilizar y estructurar aceites, ya que están constituidos por gotas de aceite dispersadas en una fase continua acuosa gelificada. En este sentido, el aceite queda físicamente atrapado en una estructura de hidrogel, la cual aporta una consistencia sólida al sistema, haciéndolo apto para su uso como análogo de grasa. Este procedimiento ha despertado un gran interés por su sencillez en la elaboración y por su eficacia (Jiménez-Colmenero et al., 2015). Estos análogos de grasa se han ensayado en diversos productos cárnicos, entre ellos cabe destacar los sistemas modelo, los productos cocidos como las salchichas tipo frankfurt, los frescos tipo hamburguesa o salchichas tipo longaniza, así como los crudo-curados. Todos ellos presentaron buenas propiedades de retención de agua y grasa, además de modificaciones en las características texturales y en la estructura de proteínas y de lípidos (Jiménez-Colmenero et al., 2013; Ruiz-Capillas et al., 2013; Triki et al., 2013; Herrero et al., 2014; Salcedo-Sandoval et al., 2014; Salcedo-Sandoval et al., 2015a).

1.3.3.4. Incorporación de aceites emulsionados

Actualmente, el empleo de emulsiones elaboradas con aceites ricos en AGM y AGP es una de las opciones más interesantes para vehiculizar biocompuestos y/o mejorar el perfil lipídico de todo

tipo de productos incluyendo los cárnicos (Bloukas et al., 1997; Muguerza et al., 2001; Lee et al., 2006; Delgado-Pando et al., 2010a; Herrero et al., 2012; Salminen et al., 2013; Xiong et al., 2016). Las emulsiones de aceite-en-agua, “*oil-in-water*” (O/W), están siendo muy estudiadas y utilizadas para su empleo como análogos de grasa en productos cárnicos. En este contexto, se ha abierto un nuevo campo de investigación relacionado con el desarrollo de novedosos sistemas de aceites emulsionados más complejos, como por ejemplo las emulsiones dobles y las emulsiones estructuradas, que presentan numerosas ventajas frente a las emulsiones convencionales. Los principales aspectos relacionados con estas nuevas tecnologías serán descritos en el siguiente apartado.

En la presente memoria se usarán los términos “sistema de liberación controlada”, “sistemas de entrega” y “vehiculización” indistintamente, ya que vienen de la traducción del inglés “*delivery system*”.

1.4. NUEVAS ESTRATEGIAS DE INCORPORACIÓN DE ACEITES: EMULSIONES DOBLES

Con el fin de mejorar las características nutricionales de las carnes procesadas habitualmente se incorporan aceites que estén más de acuerdo con las recomendaciones dietéticas. Así pues, los aceites son utilizados para el reemplazo de grasa animal. Puesto que estos materiales son líquidos a temperatura ambiente o incluso en condiciones de refrigeración, su incorporación en algunos tipos de carne procesada puede plantear dificultades tecnológicas. Por este motivo el aceite necesita ser incorporado en forma de partículas estables que no se unan durante el procesamiento o la cocción del producto, ya que de lo contrario se produciría pérdida de líquido y una baja aceptabilidad de éste. Así pues, la incorporación de aceites en forma de emulsión (O/W) es una estrategia relativamente común. Por el contrario, la incorporación de ED es mucho más novedosa además de presentar algunas ventajas con respecto a las emulsiones simples o convencionales. A continuación, se detallan algunos aspectos generales para una mejor comprensión de las emulsiones en general y sobre las ED en particular.

1.4.1. Características generales de las emulsiones y de sus componentes

Una emulsión es un sistema coloidal consistente de dos líquidos inmiscibles, donde uno de ellos (fase interna) está disperso en forma de pequeñas gotas en otro fluido denominado fase continua

o dispersa (**Figura 5**) (Dickinson y Stainsby, 1982; Dickinson, 1992). Las emulsiones se han clasificado de acuerdo a la disposición de las fases, por tanto, se dan dos tipos emulsiones:

- **Emulsiones de aceite-en-agua** (O/W, *oil-in-water*) donde unas pequeñas gotas de naturaleza lipídica están dispersas en una fase continua de carácter acuoso (**Figura 5A**).
- **Emulsiones de agua-en-aceite** (W/O, *water-in-oil*) donde unas pequeñas gotas de naturaleza acuosa están dispersas en una fase continua lipídica (**Figura 5B**).

Las emulsiones son sistemas termodinámicamente inestables debido, entre otras cosas, a la tensión superficial existente entre las fases que conforman dichos sistemas. Sin embargo, estos fenómenos pueden reducirse con el uso de surfactantes que estabilicen cinéticamente la muestra al disminuir la tensión interfacial, así como con la aplicación de condiciones de homogeneización y mezclado que permitan reducir el tamaño de partícula. El tamaño medio partícula de estas emulsiones oscila entre 100 nm y 100 μ m (McClements et al., 2009; Tran, 2011). Sin embargo, esto no es condicionante, ya que algunas de estas pueden llegar a presentar tamaños tanto superiores como inferiores a los descritos.

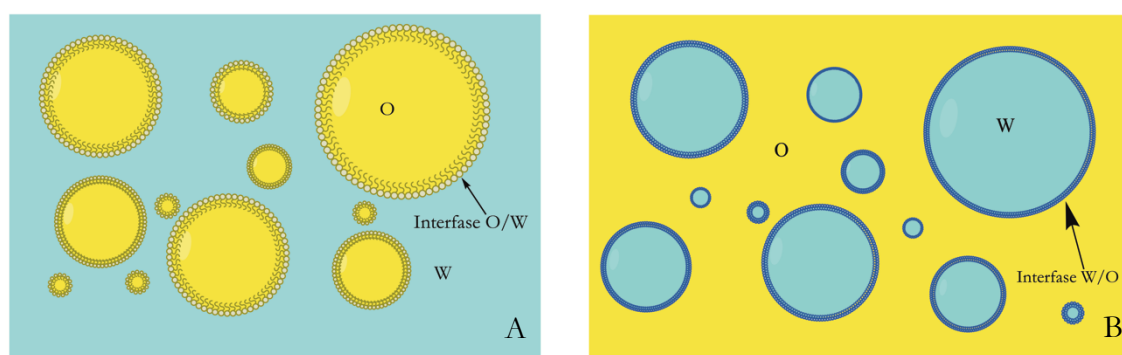


Figura 5. Representación esquemática de la emulsión O/W (A) y W/O (B).

La adición de un agente denominado **emulsionante** facilita la formación de las gotas y la estabilidad de las mismas. Los **emulsionantes** son compuestos anfipáticos que poseen una parte lipofílica, con afinidad por la fase lipídica, y otra parte hidrófila, con afinidad por parte acuosa (Garti, 1997a). Dado que los emulsionantes son agentes tensoactivos, estos son capaces de reducir la tensión interfacial y facilitar la formación de pequeñas gotas de la fase inmisible dispersa en la continua (**Figura 6**). Los emulsionantes, a su vez, van a determinar cuál de las fracciones que conforman la emulsión será la continua y cuál la dispersa (Fennema, 1996; Benichou et al., 2001).

Así pues, la interfase de una emulsión del tipo O/W estará compuesta por un tensoactivo de carácter hidrofílico. En presencia de un emulsionante lipofílico habitualmente se formará una emulsión del tipo W/O.

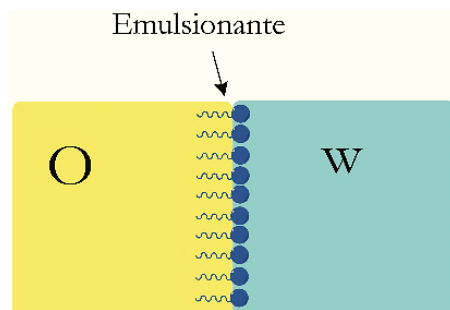


Figura 6. Emulsionante, interacción de la interfase.

En la presente memoria se usarán los términos “tensoactivo”, “surfactante” y “emulsionante” indistintamente, aunque existan algunas diferencias entre ellos, ya que, en rigor, un emulsionante es un tipo de tensoactivo.

Existen distintas clasificaciones para categorizar los diferentes tipos de emulsionantes. Una de las más utilizadas en la actualidad está basada en **el carácter de la parte hidrófila del emulsionante**. Esta clasificación permite tipificar a estas sustancias como emulsionantes no iónicos, aniónicos, anfóteros y catiónicos (Whitehurst, 2008). Sin embargo, una de las más útiles es aquella basada en **balance hidrófilo/lipófilo o HLB** “*hydrophilic lipophilic balance*”, que permite clasificar, en una escala arbitraria de 1-20, a los emulsionantes según su afinidad relativa por el aceite y el agua que conforman las fases del sistema. Así, un carácter más afín al aceite mostrará valores más cercanos a 0, mientras que los que presentan mayor afinidad al agua tienden al 20. Como se puede observar en la **Figura 7**, los emulsionantes que se encuentren entre 3-7 serán más propicios a la formación de emulsiones W/O. Este es el caso del poliglicerol del ácido polirricinoleico, (PGPR), y la lecitina. Aquellos situados entre 9-16 formarán emulsiones O/W, como es el caso de algunas proteínas como caseinato sódico, aislado de proteína de soja o de proteína de suero.

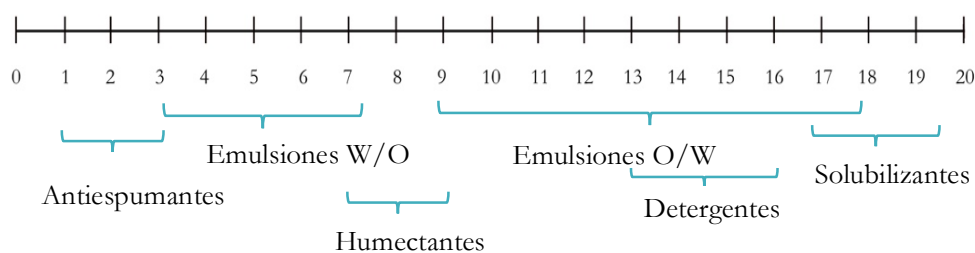


Figura 7. Aplicaciones industriales de los tensoactivos en función de la escala HLB, adaptado de Belitz et al (2009).

A pesar de que se conocen una gran variedad de emulsionantes, hay que tener en cuenta que no todos son de grado alimentario. Algunos ejemplos de los más empleados en la industria alimentaria se describen brevemente a continuación.

Emulsionantes lipofílicos

Como se ha mencionado anteriormente, existen múltiples emulsionantes incluyendo los lipofílicos o aquellos con un HLB bajo. Entre ellos se encuentran los ésteres de sorbitano, conocidos comercialmente como Span 20, 40, 60 y 80, monolaurato de propilenglicol, monoestearato de glicerilo (mono- y di-glicéridos), poliglicerol del ácido polirricinoleico o lecitinas, etc. Sin embargo, estos tres últimos, se encuentran entre los más usados en la industria alimentaria.

El PGPR es un tensoactivo no iónico elaborado a partir de la esterificación de ácidos grasos del aceite de ricino (Márquez y Wagner, 2010). El PGPR presenta un gran poder emulsionante, siendo uno de los más usados en la elaboración de emulsiones del tipo $W_1/O/W_2$ (Su, 2008).

Las lecitinas comprenden un conjunto de fosfolípidos mayoritariamente fosfatidilcolina, así como fosfatidietanolamina, fosfatidilserina y fosfatidilinositol (Castro-Gomez et al., 2015) combinado con otras sustancias tales como triglicéridos, esteroides y ácidos grasos libres (van Nieuwenhuyzen y Tomas, 2008) obtenidos a partir de huevo y de distintos aceites vegetales como la soja y, más recientemente, de semillas de maíz, girasol y colza (Bohme et al., 2016).

Los mono- y di-acilglicéridos (MDAG) comprenden otro grupo de emulsionantes de carácter no iónico obtenidos a partir de la inesterificación (glicerólisis) de triacilglicéridos de grasas y aceites comestibles de origen vegetal o animal con glicerol en presencia de un catalizador. El triacilglicérido reacciona con glicerol a alta temperatura (200-250 °C) bajo catálisis alcalina,

produciendo una mezcla de mono-, di- y triacilglicéridos y también una pequeña fracción de glicerol sin reaccionar. Los MDAG comerciales contienen usualmente 45-55% de monoacilglicéridos, 38-45% de diacilglicéridos, 8-12% de triacilglicéridos y 1-7% de glicerol libre (Norn, 2014). Puesto que la composición y características de las mezclas resultantes pueden ser bastante diferentes, algunos autores han estudiado las posibilidades tecnológicas que ofrecen dichos compuestos, así como de sus mezclas. Por ejemplo, se ha estudiado el efecto que tiene el empleo de MDAG en la estabilidad, capacidad de cristalización y el aumento de la viscosidad de la fase lipídica de las emulsiones (McClements, 2010; Ghosh y Rousseau, 2012).

Emulsionantes hidrofílicos

Al igual que en el caso anterior, existen una gran variedad de tensoactivos hidrofílicos o con un HLB elevado. Muchos de ellos son proteínas o carbohidratos de elevado peso molecular. Entre ellos podemos encontrar proteínas de distintos orígenes (vegetal como la soja o animal como las proteínas lácteas y las gelatinas), polisacáridos como los carragenatos, o distintos tipos de polisorbatos, conocidos como Tween 20, 40, 60 y 80. Actualmente proteínas alimentarias como el caseinato sódico, la proteína de soja o el aislado de proteína de suero están siendo muy utilizadas.

Caseinato sódico (NaCas): se trata de un agregado multimolecular de distintas caseínas en combinación con Na que se encuentra en su mayor parte formando “micelas de caseína”, con gran capacidad emulsionante y estabilizante de las interfases aceite-agua (Su, 2008). Una propiedad característica, que ha servido para su definición operacional, es que las caseínas precipitan a pH 4,6, que es su punto isoeléctrico.

Aislado de proteína de suero (WPI): se denomina así a la fracción proteica globular que permanece en el suero de la leche (Morr y Ha, 1993). Dichas proteínas son más sensibles al calor y menos al calcio que el caseinato, pudiendo acoplarse en intercambios tiol-disulfuro para acomodarse a las gotas de aceite gracias a su naturaleza anfipática y flexible (Kinsella y Whitehead, 1989; Chen et al., 2006).

Aislado de proteína de soja (ISP): es un extracto proteico de origen vegetal con carácter hidrofílico que tiene la facultad de disminuir la tensión interfacial y formar una barrera entre el agua y el aceite (Molina et al., 2001).

Si bien existen un gran número de posibilidades, la correcta elección del emulsionante resulta de gran importancia dependiendo del tipo de emulsión que se pretenda obtener y de las características deseadas.

1.4.2. Emulsiones dobles, métodos de obtención y estabilidad

Una **emulsión doble** (ED), también denominada emulsión múltiple (EM), es un sistema multicompartimentalizado caracterizado por la coexistencia de una emulsión de aceite en agua (O/W) y otra de agua-en-aceite (W/O), en el que los glóbulos de la fase dispersa contienen dentro de ellos gotas igualmente dispersas más pequeñas (Garti, 1997b) (**Figura 8**). Las ED se pueden clasificar en emulsiones de **aceite-en-agua-en-aceite** ($O_1/W/O_2$) o de **agua-en-aceite-en-agua** ($W_1/O/W_2$), siendo estas últimas las más utilizada en la industria alimentaria.

En la **Figura 8 (A)** se puede observar que las emulsiones de $O_1/W/O_2$ son un sistema disperso líquido-líquido, en el cual la fase interna es en sí misma una emulsión O_1/W en cuya interfase se encuentra el tensoactivo hidrofílico. Esta emulsión se encuentra dispersa en una fase lipídica externa O_2 que contiene un emulsionante lipofílico en la interfase W/O_2 responsable de su estabilización. Los sistemas $W_1/O/W_2$ (**Figura 8 B**) están constituidos por una emulsión W_1/O y un emulsionante lipofílico en su interfase. Todo ello se encuentra contenido en una fase acuosa externa (W_2) donde se halla un tensoactivo hidrofílico en la interfase O/W_2 . Dado que estos sistemas son los que ofrecen las mayores posibilidades de empleo en el marco de la temática considerada en esta memoria, todo el análisis posterior se centrará en el desarrollo de $W_1/O/W_2$, en la cual la W_1 constituye la fase acuosa interna, la O la fase lipídica y la W_2 la fase acuosa externa.

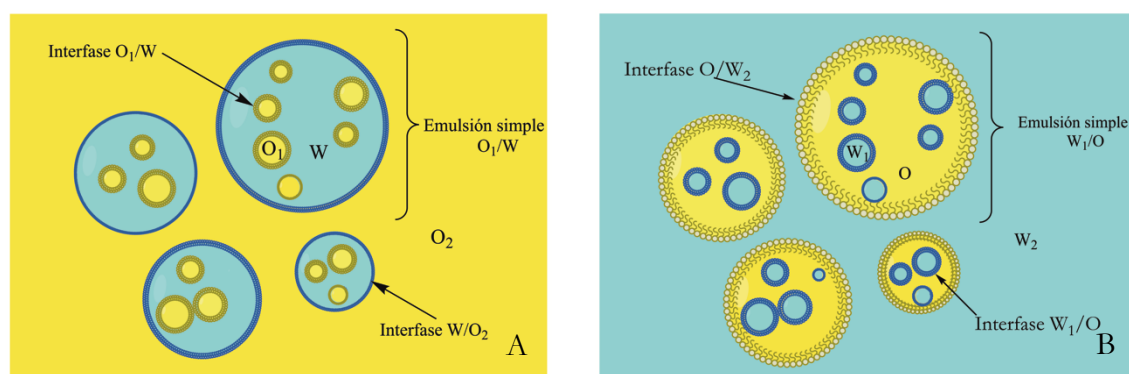


Figura 8. Representación esquemática de emulsiones dobles: $O_1/W/O_2$ (A) y $W_1/O/W_2$ (B).

La W_1 es una solución, en ocasiones tamponada, preparada con diferentes componentes combinados y que cumple con dos propósitos fundamentales: dotar al sistema de estabilidad termodinámica e incorporar los compuestos bioactivos hidrófilos a encapsular. Para ayudar a mejorar la estabilidad termodinámica del sistema, la W_1 puede estar constituida por algunas sales

(por ejemplo NaCl) que desempeñan un papel crítico en el equilibrio de la presión osmótica entre la fase W_1 y W_2 (Muschiolik, 2007). Para favorecer dicha estabilidad también se pueden añadir otros compuestos como azúcares, proteínas, y polisacáridos (Su et al., 2006; Dickinson, 2011). En lo relativo a la incorporación de compuestos bioactivos, la fase acuosa interna puede incorporar diferentes ingredientes funcionales: vitaminas, minerales, antioxidantes microorganismos, etc. que dependiendo de su naturaleza pueden requerir condiciones ambientales específicas (Jiménez-Colmenero, 2013a).

Diversos aceites vegetales (colza, soja, maíz, oliva, chía, etc.) han sido empleados como **fase lipídica** en la formación de emulsiones $W_1/O/W_2$ de grado alimentario para su potencial aplicación en alimentos (Su et al., 2006; Pimentel-González et al., 2009; Márquez y Wagner, 2010; Carrillo-Navas et al., 2012; Sapei et al., 2012; Cofrades et al., 2013). Su composición (perfil de ácidos grasos) condicionará algunas de sus propiedades químicas y físicas del sistema, entre ellas la liberación de compuestos encapsulados. En este sentido, se ha descrito una relación directa entre un aumento de la velocidad de liberación de dichos compuestos con el porcentaje de ácidos grasos saturados que constituyen la fase oleosa (Bonnet et al., 2009; Bonnet et al., 2010a). Otros autores señalan que la viscosidad de la fase lipídica aumenta con la longitud de la cadena del ácido graso y disminuye ligeramente con el grado de insaturación; de igual modo, la hidrofobicidad aumenta con la longitud de cadena y la insaturación (Phan et al., 2010).

Por tanto, dicha fase tendrá que ser escogida minuciosamente para obtener las mejores condiciones del sistema. Entre las distintas grasas potencialmente saludables para su uso en el desarrollo de productos cárnicos se encuentran aquellas que tienen un perfil de AG rico en AGM y AGP (n-3) como por ejemplo los aceites de oliva, girasol, chía, lino, perilla y otros de origen marino (Weiss et al., 2005; Brückner et al., 2007; Surh et al., 2007; Pawlik et al., 2010; Pérez-Alonso et al., 2012; Bou et al., 2014). Por otra parte, esta fase también permite incorporar en su seno componentes lipofílicos tales como antioxidantes, vitaminas liposolubles, etc. como describe Faridi et al. (2017).

La W_2 requiere la presencia de un agente emulsionante hidrofílico, cuya naturaleza y concentración condicionan las propiedades de la emulsión $W_1/O/W_2$. Con tal propósito se han empleado varios tipos de proteínas alimentarias emulsionantes tales como proteínas de suero de leche, caseinato sódico, albúmina de suero bovino, etc. También se han usado distintos hidrocoloides como la goma arábiga y almidón modificado. Además, se pueden añadir varios polisacáridos solubles como pectinas, alginatos, goma gelana, etc. que, como se describe más adelante, debido a sus propiedades espesantes y gelificantes actúan como estabilizantes favoreciendo la estabilidad del sistema (Dickinson, 2011). Sin embargo, como ya se ha comentado anteriormente, un aspecto esencial

para favorecer la estabilidad de las ED es mantener el balance osmótico entre las fases W_1 y W_2 (Bonnet et al., 2010a).

Las ED pueden ser elaboradas en una o dos etapas:

- **Elaboración en una etapa:** al sistema se le aplica una fuerte agitación mecánica, tras la cual se produce la inversión de fases. Por ejemplo, en el caso de emulsiones del tipo $W_1/O/W_2$ se parte de una fase lipídica (O) que contiene a su vez un emulsionante hidrófobo, que se mezcla con una fase acuosa (W_1) que tiene un tensoactivo hidrófilo. En esta técnica se debe introducir de forma gradual la fase acuosa (W_1), que debe ser mayor del 70% para que se pueda estabilizar la emulsión. Si bien inicialmente se produce una emulsión W_1/O , al seguir añadiendo la fase acuosa, se forma una emulsión doble ($W_1/O/W_2$) debido a la inversión de fases (Su, 2008).
- **Elaboración en dos etapas:** supone la formación inicial de una emulsión simple, también llamada emulsión primaria. En el caso de las ED del tipo $W_1/O/W_2$ primero se forma una emulsión W_1/O por agitación mecánica (**Figura 9**). A continuación, se procede a la dispersión de dicha emulsión en una fase acuosa externa en presencia de un emulsionante hidrófilo que ayudará a dispersar la emulsión simple dentro de la fase acuosa externa. En esta segunda fase la energía aplicada debe ser menor que en la primera, ya que se podría desestabilizar el sistema (Belitz et al., 2009; McClements et al., 2009).

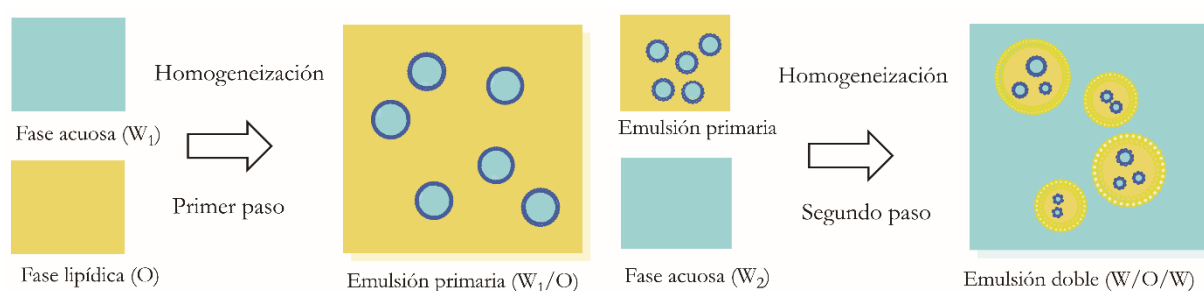


Figura 9. Representación esquemática del proceso de elaboración de la emulsión doble $W_1/O/W_2$ en 2 etapas.

En ambos procesos se necesita la aplicación de energía mecánica pudiendo emplearse para ello distintos tipos de homogeneizadores. Si bien existen múltiples tipos de homogeneizadores, cada uno de ellos presenta ventajas y desventajas, debiendo ser escogidos en función de su aplicación, volumen deseado, coste, naturaleza de los materiales, tamaño de partícula y propiedades físico-

químicas del producto final. Esto repercutirá en la naturaleza del sistema a nivel de microestructura, estabilidad de la emulsión, etc. Por tanto, estas características van a determinar sus propiedades, las posibilidades de aplicación en alimentos y las propiedades del producto final.

Entre los distintos equipos que pueden llevar a cabo estos procedimientos se encuentran los siguientes: homogeneizador de alta cizalla, molino coloidal, sonicador u homogeneizador por ultrasonidos, *microfluizider*, homogeneizador de membrana y homogeneizador de altas presiones (McClements, 2015). La obtención de emulsiones por medio del homogeneizador de altas presiones constituye el procedimiento más empleado en la industria tanto para el desarrollo de las emulsiones simples como dobles. Junto con los sistemas de molino coloidal son una de las metodologías más eficientes para conseguir emulsiones con un tamaño de partícula reducido (McClements, 2015). Dado que el homogeneizador de altas presiones ofrece excelentes posibilidades se hará una breve descripción de su funcionamiento. Este se basa generalmente en el empleo de dos válvulas reguladas a distintas presiones con las que se pueden aplicar las condiciones apropiadas en cada momento (**Figura 10**). La primera válvula será aquella donde se administrará una mayor presión, mientras que en la segunda válvula esta será menor para así no producir una posible desestabilización o rotura de la emulsión.

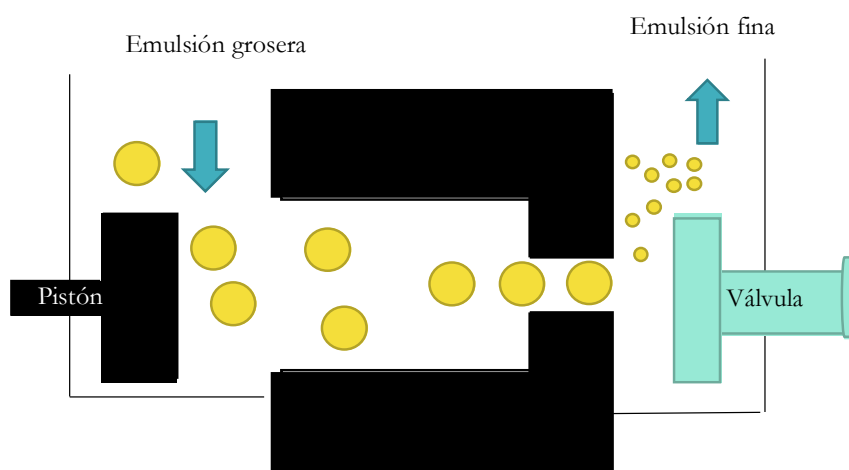


Figura 10. Válvula de homogeneizador de altas presiones.

En tales circunstancias, la emulsión grosera (que previamente puede ser obtenida con un homogeneizador convencional de cizalla u otros medios), pasa a través de una válvula con un ángulo de 90° (**Figura 10**). De esta manera, se obliga al flujo a impactar contra las paredes, produciendo después una caída de presión súbita, causando interrupciones entre las fases que favorecen la formación de gotitas. El tamaño de partícula obtenido puede variar entre 15-100 μm

o incluso llegar a ser menor de $0.1\ \mu\text{m}$, según el número de pases que se realicen y la presión aplicada al sistema (3-20 MPa) (McClements, 2015). Además del tamaño de partícula otras características del sistema como por ejemplo la tensión superficial, viscosidad del sistema, etc. pueden ser condicionadas aplicando distintos pases por el equipo (McClements, 2015).

Las ED presentan diferentes mecanismos de desestabilización, algunas de ellas comunes a las emulsiones simples, aunque con pequeñas diferencias (**Figura 11**). Tales mecanismos son: la separación de fases o cremado, floculación y coalescencia. Además, todos estos fenómenos de inestabilidad que pueden producirse a la vez o bien suceder paulatinamente, conduciendo finalmente a la rotura de la emulsión (Garti, 1997b).

Cremado (*creaming*): se define como el movimiento de las gotas hacia la superficie, siendo las de menor tamaño las que presentan una mayor resistencia a dicho efecto. Esto es debido a que la densidad de las gotitas de aceite no es igual a la de la fase acuosa (Garti y Aserin, 1998).

Floculación: es la formación de clústeres tridimensionales que se producen por un proceso de adhesión de las gotas. Este fenómeno es muy complejo ya que está causado por diferentes factores como el movimiento de Browniano, la gravedad y las características en la gota en sí. Puede desarrollarse tanto en la emulsión O/W_2 , conllevando a floculación de las gotas de aceite, como en la W_1/O , adhesión de las gotas de W_1 dentro de la gota de aceite (Garti y Aserin, 1998).

Coalescencia: se produce por el acercamiento de las gotas más pequeñas hacia las más grandes, produciendo una fusión de las mismas. Esta asociación se genera por la rotura de la fina lámina de las gotas, llamada lamela, al reducir la tensión y el área superficial de las gotas (Su et al., 2006). La posibilidad de que este efecto se desarrolle es proporcional al incremento de tiempo que pueda pasar dos gotas próximas entre sí. Por tanto, se ve favorecido con la presencia de fenómenos como el cremado y la floculación. Este fenómeno se puede presentar tanto en la fase O de la emulsión O/W_2 , como en la W_1 del sistema W_1/O .

Maduración de Ostwald: este fenómeno de inestabilidad es muy similar a la coalescencia y es característica de las W_1/O . Las gotas de la fase acuosa colisionan entre ellas dando lugar a una gota más grande y otra minúscula. Con el tiempo, estas pequeñas partículas casi se hacen imperceptibles al solubilizarse en el medio (McClements, 2015).

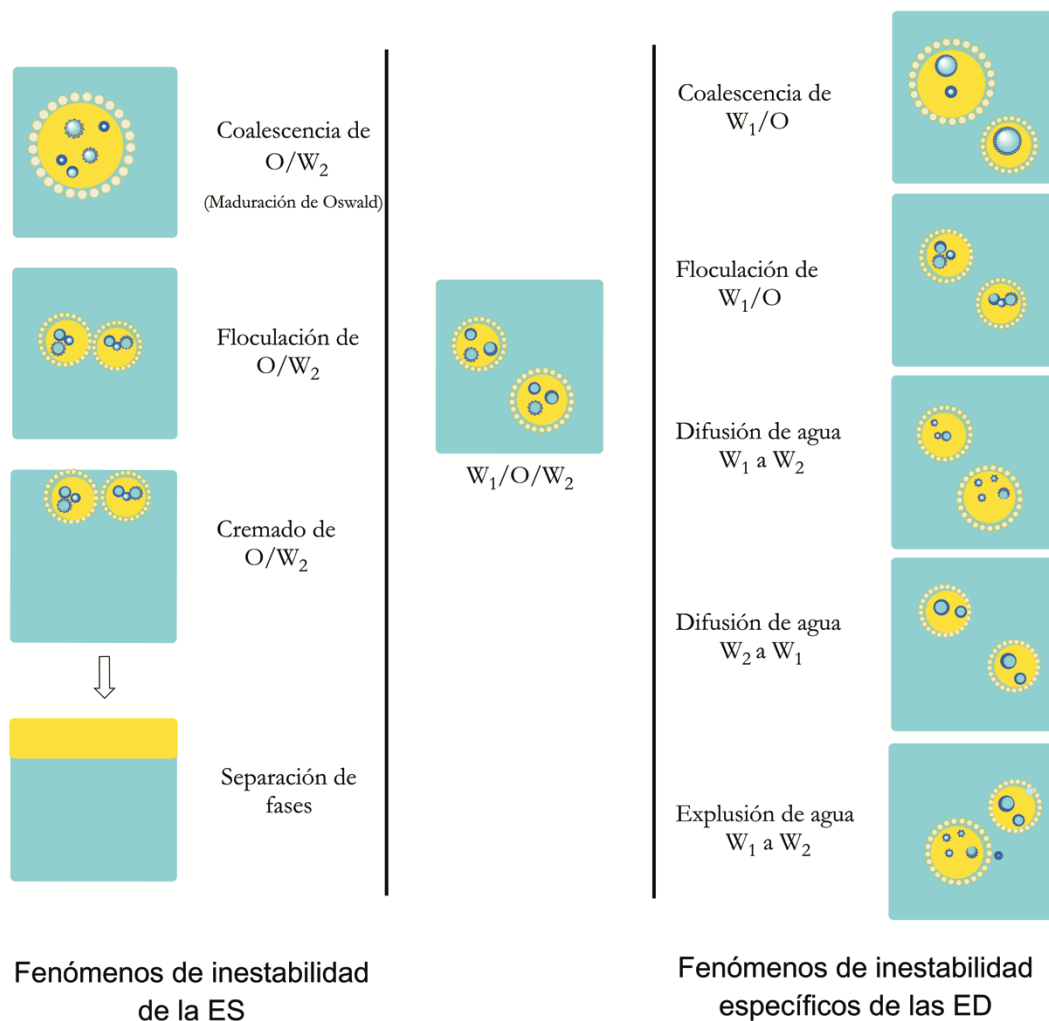


Figura 11. Fenómenos de inestabilidad de las emulsiones simples (ES) y de las emulsiones dobles (ED).

Difusión de agua: se produce una transmisión de la fase acuosa desde la W_1 a W_2 o viceversa, si el gradiente osmótico no se encuentra equilibrado, produciendo un aumento del volumen de la fase receptora. Este mecanismo de inestabilidad puede o no producir alteraciones significativas en el sistema (Benichou et al., 2007). Dicho transporte puede ser debido a fenómenos tales como la difusión del agua vía micelar o a la formación de pequeñas láminas constituidas por los tensoactivos presentes en la fase oleosa (McClements, 2015).

Expulsión de W_1 : expulsión de las gotas que conforman la fase acuosa interna (W_1) hacia el exterior producida por diferentes mecanismos.

Rotura: supone la separación de las dos fases sin que se produzca entonces ningún contacto entre ellas.

Actualmente se vienen realizando numerosos estudios encaminados hacia el desarrollo de emulsiones estructuradas más estables, y por otro lado con un mayor grado de complejidad para dotarlas de nuevas propiedades funcionales tanto a nivel nutricional como tecnológico.

1.4.3. Avances en el desarrollo y funcionalidad de las emulsiones estructuradas

Como ya se ha comentado anteriormente, las ED tienen una estructura característica que consiste en una compartimentalización de las distintas fases que componen la emulsión. Por sus características, las ED presentan varias ventajas potenciales sobre las convencionales. En este sentido, las emulsiones de $W_1/O/W_2$, permiten la encapsulación de componentes funcionales hidrófilos en la fase acuosa interna que podrían liberarse a una velocidad controlada o en respuesta a estímulos ambientales específicos (cambios de pH, fuerza iónica, temperatura, etc.). Los componentes encapsulados también podrían ser protegidos frente la degradación química, aislándolos, de este modo, de otros ingredientes solubles en la fase acuosa exterior con los que podrían reaccionar.

Actualmente son muchos los estudios que se centran en el desarrollo de este tipo emulsiones y de otras con un alto grado de complejidad. La mayoría de estos esfuerzos están enfocados en el diseño y la estructura de estos sistemas con el fin mejorar alguna o varias características, como pueden ser la estabilidad física o química, la liberación controlada de compuestos bioactivos, etc. (McClements and Li, 2010; McClements, 2012). Los avances relacionados con las bases y principios del diseño estructural de estos sistemas han llevado a acuñar el término de emulsiones y/o sistemas de liberación estructurados, que los agrupa. En general, los distintos enfoques utilizados para el diseño de emulsiones estructuradas se clasifican en tres grandes categorías:

1. *Layering*: consiste en la elaboración emulsiones rodeando las gotas de la fase dispersa con distintas capas o recubrimientos. Algunos procedimientos para su obtención y estabilización son, entre otros, el pickering o el uso de mono- y di-acilglicéridos (MDAG). El pickering consiste en la agrupación de pequeñas partículas sólidas que se organizan recubriendo a las gotitas de la fase dispersa, que es donde se encuentra la interfase de la emulsión. Algunos de los productos alimentarios basados en esta técnica son las leches reconstruidas, la margarina y las cremas untables (fatty spreads) (Dickinson, 2010). Por otro lado, el uso de MDAG también puede conllevar a la formación de pequeñas partículas

- en la interfase de la emulsión recubriendo sus gotitas con pequeños cristales (Dickinson, 2010).
2. *Clustering*: radica en la agrupación de las gotas de la fase dispersa. Este tipo de estructuración se puede conseguir a través del incremento de la concentración de la fase dispersa por distintos mecanismos, como por el aumento de su empaquetamiento de las gotas de la fase dispersa (Patel y Dewettinck, 2016), por nucleación (McClements, 2012b) o por la formación de nanopartículas de lípidos sólidos (*solid lipid particle*, SLP) (McClements et al., 2009). Estos dos últimos procedimientos se podrían desarrollar con MDAG o con hidrocoloides como la gelatina, que irían creando pequeñas partículas sólidas en el interior de la gota dispersa que conllevaría al empaquetamiento de las mismas. Algunos ejemplos en productos alimentarios desarrollados con *clustering* son la mayonesa o las salsas densas, donde la fase continua (W) está altamente concentrada.
 3. *Embedding*: consiste en la integración de las partículas dentro otras de mayor tamaño (McClements, 2012a). Las ED se engloban dentro de este tipo de tecnología y, de entre las distintas posibilidades que ofrece, destaca su utilidad en desarrollo de productos con bajo contenido en grasa. Esto se debe, en parte, al incremento de la viscosidad de las emulsiones del tipo $W_1/O/W_2$ con respecto a las emulsiones O/W con un contenido lipídico similar (Pal, 2011). Además, la presencia de grasa animal (y por lo tanto calorías) de los productos alimenticios que normalmente existen como emulsiones O/W (por ejemplo, aderezos, mayonesa, salsas, salsas, postres) se reduce, cargando la fase oleosa con gotitas de agua.

Con la finalidad de obtener un mayor grado de estructuración de las emulsiones para así conseguir unas propiedades plásticas más similares a las de la grasa animal, la formación del $W_1/O/W_2$ por *embedding* puede combinarse con otras estrategias fundamentadas en tanto el *clustering*, como en el *layering* o, incluso, otro tipo de *embedding*. De hecho, las diferentes estrategias de estructuración pueden ir dirigidas a una o a varias de las fases que componen una emulsión. Existen diversas estrategias para aumentar la consistencia de las emulsiones $W_1/O/W_2$, ya sea por procesos de *clustering* (incorporación de gelatina) en la W_1 que aumenten la viscosidad en dicha fase (Sapei et al., 2012), promoviendo fenómenos de *layering* o *clustering* a través de MDAG, entre otros, que puedan incrementar y modificar las condiciones reológicas de la fase O (Frasch-Melnik et al., 2010; Ghosh et al., 2015) o por *embedding* adicionando sustancias gelificantes que estructuren la W_2 .

Una de las estrategias más interesantes es la estructuración a través de la formación de geles (*embedding*), la cual conlleva a la formación de geles de forma más eficiente y sencilla. Un gel se puede definir como un sistema con una red tridimensional capaz de retener un líquido. Está

compuesto de un solvente y un agente gelificante, responsable de aportar la estructura deseada al sistema. Con lo cual, las propiedades reológicas de estos sistemas vendrán aportadas principalmente por la fase que ha sido gelificada (Dickinson, 2012), aunque algunos autores, como Sato et al. (2014), indican que la emulsión y su tamaño de partícula pueden aportar modificaciones en las características de dichos sistemas. Así mismo, la formación de geles permite la integración y estructuración de distintos compuestos en su interior. En este sentido, tanto el método de estructuración como el agente gelificante serán escogidos atendiendo a la naturaleza del sistema y la minimización de los efectos negativos que puedan aparecer durante el transcurso de la estructuración, entre los que se encuentran la oxidación lipídica, el sabor, el color y la consistencia, que pueden limitar el uso de estos sistemas en productos cárnicos (Jiménez-Colmenero et al., 2015). Así pues, el desarrollo de ED con tales características representa una vía interesante para el desarrollo de análogos de grasa.

Los geles se pueden clasificar en hidrogeles y organogeles atendiendo a la naturaleza del solvente del sistema (**Figura 12**). Los hidrogeles son aquellos en los que el solvente del sistema es acuoso o de naturaleza polar. La formación de este tipo de gel puede producirse por diversos métodos, que van a condicionar, por tanto, su estructuración y sus características:

- Métodos químicos: incluye el uso de polisacáridos y proteínas como agentes gelificantes. La gelificación por métodos químicos también se puede desarrollar mediante la formación de complejos de polisacáridos con proteínas, con el objetivo de constituir una estructura más estable (Lam y Nickerson, 2013). Dentro de este tipo de mecanismos existe la posibilidad de gelificar proteínas mediante la bajada de pH por debajo del punto isoelectrico (Dickinson, 2012). Algunos ejemplos de esta estrategia son las caseínas en la elaboración de los yogures por su precipitación o la gelificación inducida por la hidrólisis de glucono- δ -lactona (Montes de Oca-Avalos et al., 2016).
- Gelificación térmica: está basada en la desnaturalización y agregación de las proteínas, provocada por el cambio conformacional inducido por calor. Por tanto, los geles se estabilizan por puentes disulfuro intra- e inter-catenarios e interacciones hidrofóbicas que se forman en la desnaturalización-agregación de la proteína. La gelificación y el tipo de gel formado dependen de muchos factores, tales como la fuerza iónica, pH, temperatura, tiempo de calentamiento, así como del tipo y la concentración de proteína. Otros geles formados por tratamiento térmico son los desarrollados con proteína del suero (WPI) o cualquiera procedente de los productos lácteos (β -albumina, por ejemplo) o del huevo (Dickinson, 2012).

- Procedimientos enzimáticos: consiste en la adición de enzimas cuya actividad va a modificar la naturaleza de los enlaces peptídicos. Entre los más empleados se encuentra la utilización de la enzima transglutaminasa, que potencia la formación de enlaces covalentes, catalizando grupo ϵ amino de la lisina con el grupo γ carboxi-amida de la glutamina (De Jong y Koppelman, 2002; Dickinson, 2012). Estos grupos pueden estar presentes en la proteína que se ha usado para estabilizar la emulsión o que se ha añadido en el medio para tal fin (Delgado-Pando et al., 2010b; Herrero et al., 2011). El rango óptimo de actuación de esta enzima se encuentra entre un pH de 6 y 7 a 50 °C, aunque el 90-100% de la actividad enzimática se mantiene en un rango de pH entre 5 y 9. Debido al carácter covalente de los enlaces, el sistema presenta propiedades elásticas, rígidas y termoestables (Delgado-Pando et al., 2010b). Algunos autores ya han desarrollado algunas aproximaciones de emulsiones O/W gelificadas con este procedimiento en productos cárnicos (Delgado-Pando et al., 2010b; Pintado et al., 2015).

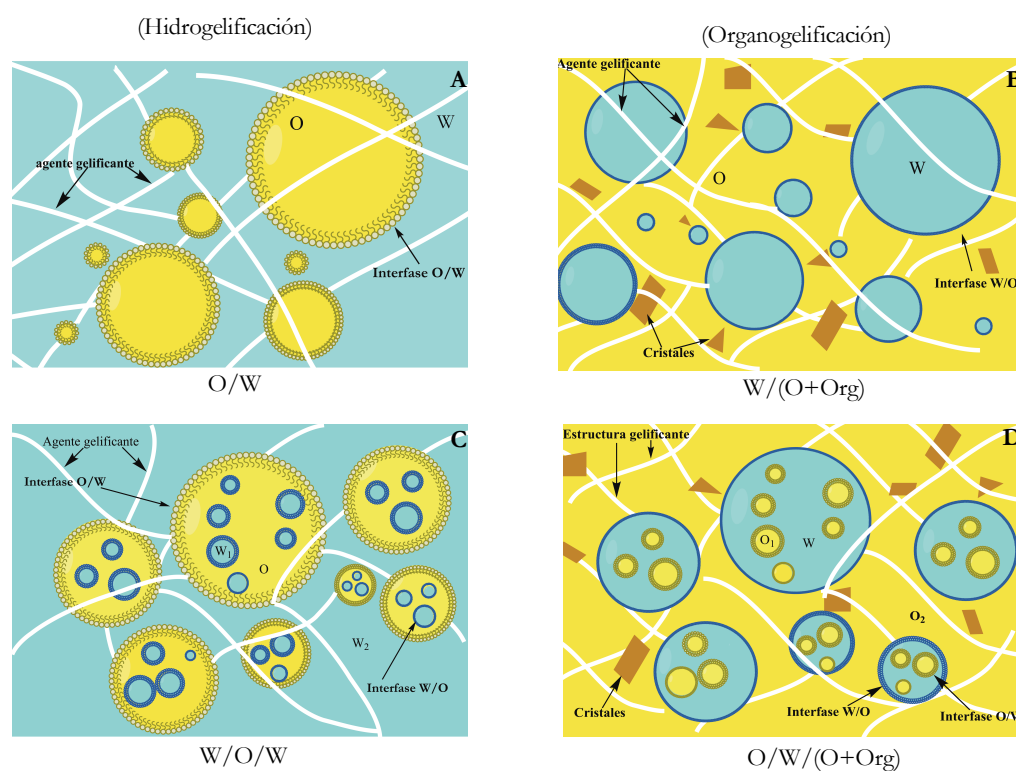


Figura 12. Ejemplos de emulsiones estructuradas hidrogelificadas (A y C) y organogelificadas (B y D).
 Adaptado de Jiménez-Colmenero et al. (2015).

Los organogeles son aquellos geles en los que la naturaleza del solvente es orgánica (**Figura 12**). Si se utiliza un aceite comestible como fase orgánica el sistema se puede denominar oleogel (Sagiri et al., 2014b). En el caso de los organogeles, se denomina como organogelificante (*organogelador*) al

agente gelificante o estructurante del sistema. Estos sistemas se pueden clasificar como geles químicos o físicos según el tipo de interacciones químicas involucradas en el proceso de elaboración (Sagiri et al., 2014a). Además, se pueden producir por dos mecanismos de estructuración: por auto-ensamblaje (formado por la organización de una red tridimensional a nivel molecular que estabiliza la fase oleosa) o por cristalización de la fase oleosa, por ejemplo por la presencia de ciertos MDAG que pueden determinar procesos de nucleación y cristalización que ayuden a la estabilización y estructuración del sistema (Jiménez-Colmenero et al., 2015; Salcedo Sandoval, 2015). Otra posible clasificación estaría basada en el tipo de organogelificante: poliméricos o de bajo peso molecular. Entre estos últimos se encuentran triacilglicéridos, MDAG, ácidos grasos, alcoholes grasos, ceras, ésteres de cera y monoestearato de sorbitán. Por otro lado, los poliméricos muestran un gran potencial, ya que muchos son de grado alimentario y bajo coste, siendo la etilcelulosa uno de los más interesantes (Co y Marangoni, 2012; Jiménez-Colmenero et al., 2015).

Varios autores han desarrollado distintos sistemas de liberación estructurados (agente de carga, emulsión estructurada por hidrogelificación u organogelificación, etc.) para su uso como ingrediente alimentario. Algunos de estos sistemas están recogidos en la **Tabla 7**.

Cabe destacar, que algunos de estos aceites estructurados ya han sido incorporado en productos cárnicos (hamburguesas, salchichas frescas o salami) como las emulsiones gelificadas con polisacáridos como el alginato (inducido por la adición de iones calcio) y k-carragenato, obteniendo buenas propiedades tecnológicas y sin menoscabo en sus atributos sensoriales (Poyato et al., 2014; Pintado et al., 2015; Poyato et al., 2015; Alejandre et al., 2016).

Tabla 7. Ejemplos de sistemas de aceites estructurados con posibilidad de incorporar a alimentos.

Tipo/compuesto empleado	Aceite	Referencia
O/W estructurada de galactomanano (1%)	Girasol	(Patel et al., 2014)
O/W estructurada de aislado de proteína de soja: κ - carragenato (conjugados)	Girasol	(Tavernier et al., 2017)
O/W estructurada de κ -carragenato (concentraciones de 0,3-1,7%)	Lino	(Poyato et al., 2014)
O/W estructurada de: glucono-delta- lactona (20% y 40%)	Girasol	(Montes de Oca-Avalos et al., 2016)
O/W estructurada de caseinato sódico (5%), aislado de proteína de soja (5%) y transglutaminasa (0,3%)	Mezcla de aceites	(Delgado-Pando et al., 2010b)
O/W estructurada con avena, gelatina y alginato en distintas concentraciones	Oliva	(Pintado et al., 2016a)

1.4.3.1. Emulsiones estructuradas de grado alimentario

Como ya se ha comentado anteriormente, las emulsiones estructuradas mediante procesos de gelificación ofrecen interesantes posibilidades para sustituir la grasa de origen animal. Su principal ventaja frente a las emulsiones convencionales es su naturaleza sólida, muy similar a la grasa de origen animal. Así pues, tecnológicamente, presentarán mejores opciones como ingrediente por sus características a nivel de textura y reología. Además, estos sistemas pueden ser interesantes a nivel nutricional puesto que pueden mejorar el perfil lipídico y encapsular compuestos bioactivos.

Existen pocas aplicaciones de incorporación de emulsiones estructuradas como ingrediente en los productos cárnicos. La mayoría de estas aplicaciones han sido desarrolladas por medio de la estructuración por gelificación de emulsiones simples del tipo O/W. La aplicación de estas se ha centrado principalmente en la mejora del perfil lipídico en diversos tipos de productos cárnicos.

1.4.3.2. Aplicación de emulsiones dobles de grado alimentario en productos cárnicos

Las ED presentan múltiples posibilidades en el desarrollo de alimentos más saludables, incluyendo los productos cárnicos, al poder mejorar el contenido lipídico por sustitución de grasa animal, vehiculizar compuestos bioactivos para su mejor asimilación en el organismo o posibilitar la reducción del contenido en sodio. Aunque algunas de estas posibles aplicaciones aún no han sido ensayadas en productos cárnicos, estas se resumen a continuación:

1.4.3.2.1. Mejora del contenido lipídico

Como ya se ha descrito anteriormente una de las ventajas más importantes es que estos sistemas pueden emplearse para modificar el contenido lipídico mediante dos mecanismos: reducción del nivel de grasa y mejora del perfil de ácidos grasos. **La reducción del nivel de grasa** se realiza sustituyendo la grasa animal por emulsiones en las cuales parte del material lipídico contiene agua produciéndose así una dilución de la fase lipídica (Jiménez-Colmenero, 2013b).

La otra posibilidad que ofrecen es la **modificación del perfil de ácidos grasos** lo que favorecerá el desarrollo de productos más saludables. En este caso, la elección de la fase lipídica en los sistemas se presenta como una estrategia interesante para mejorar la composición: reduciendo la proporción de AGS e incrementando la presencia de AGM y AGP. Para ello cabría usar para la formación de los nuevos sistemas una fase lipídica compuesta por aceites de origen vegetal, tales como: aceites de oliva, girasol, chía, perilla, lino y/o aceites marinos caso de pescado y algas. Actualmente, se han incorporado ED elaboradas con aceite de oliva en productos cárnicos tipo gel/emulsión, salchichas tipo frankfurt con resultados satisfactorios en relación al carácter tecnológico, sensorial y nutricional (Cofrades et al., 2013; Serdaroglu et al., 2016).

1.4.3.2.2. Encapsulación de compuestos bioactivos

Las ED pueden ser utilizadas como un sistema vehiculización de compuestos funcionales en procesos de reformulación de alimentos (Bonnet et al., 2009; Dickinson, 2015; McClements, 2015; Muschiolik y Dickinson, 2017). Si bien, a tales efectos, estos compuestos aún no han sido incorporados en productos cárnicos, su incorporación en la reformulación presenta gran interés nutricional. Estos biocompuestos se pueden localizar, teniendo en cuenta su naturaleza hidrofílica o lipofílica, en las distintas fases, como se observa en **Figura 13**. Entre las principales ventajas de la encapsulación de dichos compuestos se encuentran: protección del ingrediente frente a otros

componentes externos, liberación controlada del compuesto bioactivo y mejora de propiedades sensoriales a través de su influencia sobre la palatabilidad del alimento.

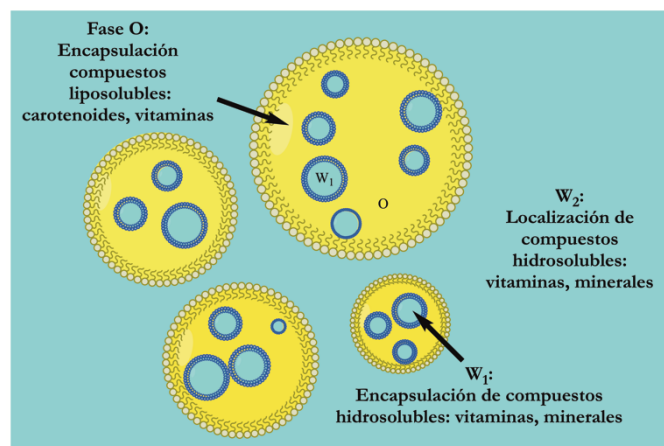


Figura 13. Ejemplo de distintas posibilidades de localización de biocompuestos en ED.

A continuación, se revisan algunos ejemplos de posibles ingredientes funcionales encapsulados para su futura incorporación en alimentos incluyendo los productos cárnicos **Tabla 8**:

Minerales: la incorporación de estos oligoelementos es de gran interés debido a que algunos de ellos como Ca, Fe, Mg, Si, Zn, están relacionados con múltiples funciones del organismo. Estas incluyen el desarrollo óseo, transporte de oxígeno en el organismo, reacciones enzimáticas a nivel celular, propiedades cognitivas, etc. Además, su enriquecimiento directo está limitado en algunos alimentos. Por ejemplo, el Ca^{2+} adicionado interacciona con las proteínas y fosfolípidos presentes en bebidas de soja formando agregados que acaban precipitando; por tanto, la incorporación de Ca vía emulsión evita estas complicaciones (Márquez y Wagner, 2010).

Igualmente, el Fe presenta limitaciones en su incorporación en alimentos cuando este se agrega como bisglicinato de hierro u otras formas de hierro solubles dado que puede aumentar la oxidación de los alimentos. Por tanto, su incorporación puede llevar a cabo a cambios en el sabor de los alimentos y finalmente ser rechazados por los consumidores. A pesar de esto la incorporación de hierro encapsulado en una emulsión es una posibilidad interesante tanto desde un punto de vista nutricional como tecnológico en el desarrollo de análogos de queso (Jiménez-Alvarado et al., 2009).

Asimismo, el Mg presenta complejidades en su adición directa al producto al generar alteraciones en el sabor e inducir a la degradación química y la agregación de las proteínas. Algunos autores han estudiado su encapsulación en la fase W_1 obteniendo DE con características similares a aquellas que no presentan biocompuestos en su composición, abriendo una puerta a la incorporación dichos sistemas en productos lácteos (Bonnet et al., 2009).

Vitaminas: Estos oligoelementos pueden ser incorporados en las distintas fases que conforman los sistemas dependiendo de su solubilidad (en la fase acuosa o lipídica). Varios autores han estudiado la encapsulación de vitamina C para su incorporación en leche, y cuya estabilidad se ve afectada frente a las altas temperaturas, pH, luz y oxígeno (Belitz et al., 2009; Lutz et al., 2009).

En relación con las vitaminas del grupo B, se está estudiando la encapsulación de las B_{12} , B_1 y B_2 . En particular, la vitamina B_{12} está siendo considerada una buena candidata para el desarrollo de alimentos funcionales debido a su gran implicación en el desarrollo de algunas funciones del organismo y debido al elevado porcentaje de la población que presenta una deficiencia en este oligoelemento (de Benoist, 2008). Por otro lado se han llevado a cabo estudios de liberación controlada y de eficiencia de encapsulación de las vitaminas B_1 y B_2 en ED (Owusu et al., 1992; Bou et al., 2014). Li et al. (2012) propusieron la encapsulación simultánea de la vitamina B_2 en la fase W_1 y de la vitamina E en la fase lipídica (O) en una emulsión del tipo $W_1/O/W_2$.

Microorganismos: en los últimos años se ha incrementado el interés en determinados microorganismos como prebióticos, entre ellos, las bacterias ácido-lácticas (LAB). Entre los distintos métodos de encapsulación estudiados para la obtención de una amplia gama de alimentos probióticos, las ED constituyen una alternativa muy interesante (Pimentel-González et al., 2009; Shima et al., 2009; Eslami et al., 2017).

Carotenoides: desde hace décadas se ha incrementado el interés en este conjunto de compuestos debido a su efecto protector frente múltiples enfermedades: cáncer, ECV, etc. El desarrollo de distintos sistemas coloidales como ED han permitido la encapsulación dichos compuestos como β -caroteno, luteína, criptoxantina en la fase lipídica (Rodríguez-Huezo et al., 2004).

Polifenoles: los compuestos fenólicos de origen natural han llamado la atención de la comunidad científica en los últimos años dado los múltiples beneficios para la salud que les han sido atribuidos, como una gran capacidad antioxidante, actividad anticancerígena, efectos antiinflamatorios, etc. El inconveniente reside en que muchos de estos compuestos son lábiles y deben ser protegidos de la luz solar y de la oxidación. Es por ello que su encapsulación en distintos sistemas como las ED

puede ser un gran avance para su incorporación en distintas matrices alimentarias. En este contexto, se han desarrollado diferentes estudios sobre el resveratrol y el HXT (Hemar et al., 2010; Cofrades et al., 2017). El HXT que se encuentra en el aceite de oliva y ya ha sido clasificado como *novel food* por la UE (Paradiso et al., 2016).

Tabla 8. Ejemplos de nutrientes y otros biocompuestos encapsulados en $W_1/O/W_2$ de grado alimentario.

Compuesto encapsulado	Referencia
Minerales	
Mg	(Bonnet et al., 2009; Bonnet et al., 2010b)
Fe	(Choi et al., 2009; Jiménez-Alvarado et al., 2009)
Si	(Cofrades et al., 2016)
Vitaminas	
B ₁	(Benichou et al., 2007)
B ₂	(Li et al., 2012; Bou et al., 2014)
B ₁₂	(Fechner et al., 2007; Kukizaki y Goto, 2007; O'Regan y Mulvihill, 2010)
C	(Carrillo-Navas et al., 2012)
E	(Li et al., 2012)
Microorganismos	
Bacterias ácido lácticas	(Eslami et al., 2017) (Pimentel-González et al., 2009)
Antioxidantes - Fenoles	
Resveratrol	(Hemar et al., 2010)
Carotenoides	(Mehrnia et al., 2017)
Otros	
Cafeína	(Hernandez-Marin et al., 2016)

Otros compuestos: entre los múltiples compuestos que pueden ser encapsulados en emulsiones del tipo $W_1/O/W_2$ se encuentra la cafeína. Este alcaloide (xantina) es un estimulante del sistema

nervioso central frecuentemente consumido en el mundo. Su incorporación en productos tiene inconvenientes por su astringencia y amargor además de su rápida absorción en el torrente sanguíneo. Es por ello que se ha incorporado en productos lácteos tipo yogurt vía ED (Hernandez-Marin et al., 2016).

1.4.3.2.3. Reducción de sodio

Desde hace décadas se ha evidenciado que el consumo de sal (sodio) es uno de los principales factores que incrementa la presión arterial y, a su vez, las ECV. Dado que la reducción de la ingesta de sal de la población en todo el mundo produciría una importante mejora en la salud pública (OMS, 2003), la industria alimentaria tiene como principal reto generar productos con niveles reducidos de sodio y mantener su aceptación sensorial para el consumidor. En este contexto, las ED podrían utilizarse como una estrategia para reducir la sal (sodio) en los alimentos (Dickinson, 2011). Se ha señalado que la introducción de sal únicamente en la fase acuosa externa de estos sistemas provoca que la percepción de salado en el producto sea mayor que lo justificado por el contenido real de sal (Koliandris, 2011). Por ello, se ha postulado que se podría alcanzar incluso una reducción de hasta el 80% del contenido en sal en determinados alimentos (Norton y Norton, 2010).

Si bien el uso de ED muestra numerosas ventajas, como se ha señalado anteriormente, estas también presentan un inconveniente tecnológico a la hora de su incorporación a determinados productos cárnicos, ya que su estructura líquida, distinta a la de la grasa animal, puede presentar ciertas limitaciones en la naturaleza de los productos. Por otro lado, algunas de las investigaciones más recientes se están dirigiendo al estudio de análogos de grasa con características similares a la grasa de origen animal. Así pues, el desarrollo de ED en combinación con otras estrategias de estructuración encaminadas a mejorar sus características para su posterior aplicación como análogos de grasa tiene gran interés.

1.5. DESARROLLO DE PRODUCTOS CÁRNICOS MÁS SALUDABLES

En general, las estrategias relacionadas con el desarrollo de emulsiones estructuradas y ED como nuevos materiales lipídicos han sido estudiadas fundamentalmente a nivel de diseño, formación, estructura y propiedades de las mismas. Actualmente, a pesar de las prometedoras aplicaciones, apenas existen ejemplos de incorporación de estos sistemas en alimentos, especialmente en

productos cárnicos. Con lo cual, aun no se conoce en profundidad el comportamiento de estos sistemas en matrices alimentarias.

Como se ha indicado anteriormente, los productos cárnicos son susceptibles de mejora en su composición. Entre ellos pueden destacar las posibilidades que ofrecen los productos frescos como las hamburguesas y productos tratados con calor, como las salchichas tipo frankfurt. Por sus propiedades, precio y distintos factores de conveniencia, son alimentos de gran aceptación para sectores específicos de la población. No obstante, presentan algunas limitaciones en su composición asociadas a aspectos cualitativos y cuantitativos de su material lipídico. En tal sentido, por sus características, estos productos resultan especialmente apropiados para experimentar procesos de reformulación. Desde hace décadas se han venido ensayando diferentes estrategias para limitar el impacto que algunos de sus componentes pueden presentar en la salud de los consumidores; estas hacen referencia a aspectos tales como reducción de sal, nitritos, colesterol o de grasa y la mejora del perfil lipídico (Olmedilla-Alonso y Jiménez-Colmenero, 2014). A fin de entender mejor la aplicación de estas reformulaciones sobre dichos alimentos, a continuación, se detallan algunos aspectos específicos de los productos mencionados.

1.5.1. Productos tipo gel/emulsión

Las salchichas tipo frankfurt son productos cárnicos tipo gel/emulsión, es decir, un sistema donde coexisten estructuras de emulsión y de gel.

Una emulsión cárnica estará constituida por una fase dispersa, glóbulos de grasa, y una fase continua, una disolución acuosa de sales, proteínas (solubles e insolubles), porciones de fibra y restos de tejido conectivo. Los agentes emulsionantes serán las proteínas cárnicas (principalmente la miosina) solubilizadas en una solución salina. Tales proteínas presentan un carácter polar que le permite establecer uniones hidrófilas con la fracción acuosa e hidrófobas con las grasas, constituyendo una matriz proteica o película alrededor del glóbulo de grasa (**Figura 14**). La estabilidad de dicha emulsión dependerá del grado de extracción y solubilización de las proteínas, que estará asociada a la concentración de sal además del pH de la carne, la temperatura, el grado de picado que repercute en el tamaño de los glóbulos de grasa y la viscosidad de la emulsión (Salcedo Sandoval, 2015).

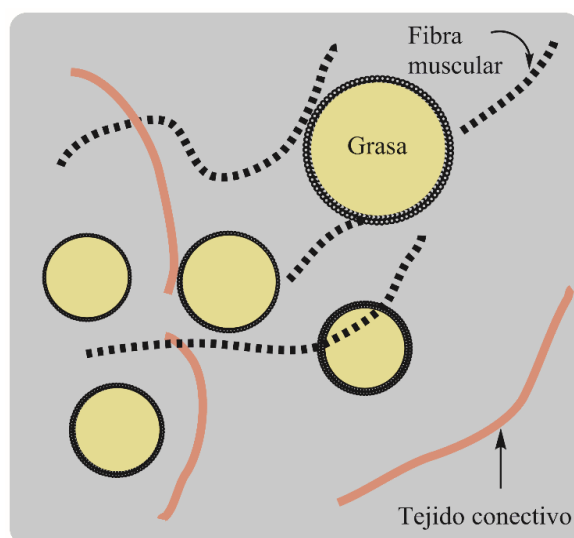


Figura 14. Representación esquemática de una emulsión cárnica.

Tras la realización de la emulsión cárnica se procede al embutido en tripas, posteriormente, se lleva a cabo un tratamiento térmico a elevadas temperaturas, dando lugar a la formación de la estructura de gel. Una vez alcanzados los 45 °C en el interior, las proteínas miofibrilares inician el proceso de desnaturalización, produciéndose un despliegue de las cadenas polipeptídicas que posteriormente se asocian mediante distintos tipos de enlace, originando unas redes tridimensionales a medida que aumenta la temperatura. En el interior de estas redes se encuentran inmovilizadas moléculas de agua y partículas de grasa, además de otros componentes del sistema. La estabilidad del gel formado dependerá fundamentalmente de factores como temperatura, pH, concentraciones de sal y proteína. El tratamiento térmico finaliza al alcanzar los 70 °C en el centro térmico, asegurando la destrucción de la carga microbiana patógena para la posterior comercialización en refrigeración.

La reducción del porcentaje de grasa, así como la mejora del perfil lipídico son dos de los enfoques mayormente estudiados debido a las recomendaciones de salud (OMS, 2003). La incorporación de aceites de origen vegetal, como el aceite de oliva, girasol, lino, colza, soja o marino (pescado o algas) ha sido una de las estrategias más aplicadas para mejorar dicho producto. Gracias al perfil lipídico de estos aceites ricos en AGM y AGP, las salchichas mejoran considerablemente sus propiedades nutricionales al sustituir (total o parcialmente) la grasa animal por dichos aceites (Tabla 9).

Tabla 9. Ejemplos de las estrategias de incorporación de aceite para mejorar el perfil de ácidos grasos empleadas en salchichas tipo frankfurt.

Estrategia de incorporación	Tipo de aceite	Contenido de grasa (g/100g)	Referencia
Directa (líquido)	Girasol alto oleico	17	(Park et al., 1989)
	Cacahuete	15	(Marquez et al., 1989)
	Girasol alto oleico	12-29	(Park et al., 1990)
	Oliva	18-21	(Lurueña-Martínez et al., 2004)
Aceites interestificados	Semilla de algodón	18-19	(Vural et al., 2004)
	Oliva	18-21	(Vural et al., 2004)
	Colza y manteca	25	(Cheong et al., 2010)
O/W de caseinato sódico (NaCas)	Mezcla de aceites oliva, lino, marino	15	(Delgado-Pando et al., 2010a)
O/W de proteína de suero de leche (WPI)	Mezcla de aceites oliva, lino, marino	15	(Delgado-Pando et al., 2010a)
O/W de aislado de proteína de soja (ISP)	Mezcla de aceites oliva, lino, marino	15	(Delgado-Pando et al., 2010a)
O/W de proteína de suero de leche (WPI)	Aceite de origen marino	5-20	(Salminen et al., 2013)
O/W estructurada con alginato, gelatina y transglutaminasa microbiana (TGM)	Oliva	30-15	(Pintado et al., 2016b; Pintado et al., 2016c)
Agente de carga basado en konjac	Mezcla de aceites oliva, lino y aceite de pescado	4-5	(Salcedo-Sandoval et al., 2013)
Organogel elaborado mediante etilcelulosa al 10%	Aceite de soja, lino y colza	25	(Zetzl et al., 2012)

Entre otras estrategias, la adición directa de aceites vegetales es una de las más empleadas a lo largo de las últimas décadas (Marquez et al., 1989; Park et al., 1989; Park et al., 1990). Otra posibilidad estudiada ha sido la elaboración salchichas con aceites vegetales interestificados tales como oliva, palma, colza, etc. (Vural, 2003; Vural et al., 2004; Cheong et al., 2010). Así mismo, la incorporación de aceites emulsionados (O/W) ha ofrecido grandes posibilidades en el desarrollo de estos productos (Delgado-Pando et al., 2010a; Salminen et al., 2013). Aunque actualmente se está estudiando la incorporación de aceites a través de emulsiones (O/W) estructuradas por gelificación

(Pintado et al., 2016b), agentes de carga (Salcedo-Sandoval et al., 2013) y oleogeles (Zetzl et al., 2012), obteniéndose productos cárnicos con buenas características tecnológicas y sensoriales. Cabe mencionar que algunos de estos estudios realizan un enfoque múltiple ya que además de mejorar el perfil lipídico, incorporan diversos ingredientes tales como algas, nuez, fibra, etc. (Ayo et al., 2007; Cofrades et al., 2009).

1.5.2. Productos frescos: hamburguesas

Las hamburguesas son productos cárnicos frescos elaborados con carne picada y que permiten la agregación de otros ingredientes, usualmente tejido adiposo, y sal, utilizada por razones tecnológicas y organolépticas, si bien, actualmente, también se están comercializando congeladas o cocinadas. Estos alimentos suelen presentar un grado de picado grueso (5-8 mm) para dotarlos de una textura fibrosa y desmenuzable. Dado que también pueden contener otros compuestos como pan, vegetales, fibras, etc., en estos casos, sería más acertado denominar a estos productos como “tipo hamburguesa”. El hecho de que los productos picados por su estructura pueden tener una elevada carga microbiana capaz de crecer con rapidez hace que su estabilidad (vida útil) sea limitada.

Las hamburguesas han sido modificadas con el fin de mejorar su composición desde distintos ámbitos, como supone una mejor adecuación del perfil lipídico a las recomendaciones actuales, acompañada de la incorporación de antioxidantes, como el licopeno (García et al., 2009) (**Tabla 10**). Entre los estudios de reemplazo de grasa animal, se han ensayado algunos como la incorporación de aceites de origen vegetal directamente (Dzudie et al., 2004; Hur et al., 2008; Rodríguez-Carpena et al., 2011; Jung y Joo, 2013). Otros autores los han incorporado parcialmente hidrogenados con la finalidad de obtener una consistencia sólida (Liu et al., 1991). Otra posibilidad ha sido la adición de aceites emulsionados, reduciendo el contenido lipídico hasta el 10% (López-López et al., 2010). Novedosas incorporaciones se han realizado con agentes de carga a base de konjac y mezcla de aceites ricos en AGP n-3 obteniendo hamburguesas con solo un 2% de grasa (Salcedo-Sandoval et al., 2014) y emulsiones simples (O/W) estructuradas con carragenato y aceite de girasol con un contenido lipídico final cercano al 15% (Poyato et al., 2015).

Tabla 10. Ejemplos de las estrategias de incorporación de aceite para mejorar el perfil de ácidos grasos empleadas en hamburguesas.

Estrategia de incorporación	Aceite	Contenido de grasa (g/100g)	Referencia
Directa (Líquido)	Soja	5-20	(Jung y Joo, 2013)
	Oliva virgen extra	5	(Hur et al., 2008)
	Maíz	15-20	(Dzudie et al., 2004)
	Cacahuete	15-20	(Dzudie et al., 2004)
	Aguacate	10	(Rodríguez-Carpena et al., 2011)
Hidrogenado	Soja	9,6	(Liu et al., 1991)
	Semilla de algodón	9,9	(Liu et al., 1991)
	Aguacate	9,6	(Liu et al., 1991)
O/W con aislado de proteína de soja	Oliva virgen extra	10	(López-López et al., 2010)
O/W estructurada con carragenato	Girasol	15-18	(Poyato et al., 2015)
Agente de carga de konjac	Mezcla de aceites oliva, lino y aceite de pescado	2-15	(Salcedo-Sandoval et al., 2015a)

Es base a todo lo expuesto cabe señalar que la utilización de ED y EDG permitirían paliar algunas de las limitaciones asociadas a los procesos de reformulación para mejorar el perfil lipídico, así como favorecer la vehiculización de compuestos bioactivos en matrices cárnicas.

Objetivos

2. OBJETIVOS

El **objetivo general** de la presente tesis doctoral consiste en el **diseño y desarrollo de emulsiones dobles y emulsiones dobles estructuradas como sistema de entrega de compuestos bioactivos y su aplicación como análogos de grasa en el desarrollo de productos cárnicos funcionales.**

Esto supone, por un lado, la aplicación de distintas estrategias para la formulación de dobles emulsiones ($W_1/O/W_2$) como sistemas de entrega de compuestos bioactivos que presenten una composición y características estructurales apropiadas para su utilización como sustituto de grasa. Aunque la formación de emulsiones dobles para su empleo como ingrediente en la reformulación de distintos alimentos ha recibido gran atención en los últimos años, el estudio de las posibilidades de estructuración de estos sistemas resulta totalmente novedosa. El desarrollo de estos sistemas representa un notable reto tecnológico por tratarse de sistemas muy complejos y limitada estabilidad. Además, el desarrollo de tales sistemas de entrega supone ensayar diferentes procesos de reformulación de productos cárnicos funcionales y evaluar las consecuencias de su incorporación en matrices cárnicas.

Para abordar este objetivo general, se plantearon los siguientes **objetivos específicos**:

- I. **Desarrollo y obtención de emulsiones dobles como sistemas de entrega de compuestos bioactivos que, en base a su composición y características estructurales, puedan emplearse como análogos de grasa.** Para ello, primero se pretende diseñar dichas emulsiones como agentes vehiculantes de compuestos bioactivos, tales como los ácidos grasos mono y poliinsaturados por medio de la incorporación de distintos aceites vegetales (oliva, chía y perilla) en la fase lipídica de la emulsión, así como de otros biocompuestos incluidos en la fase acuosa interna, caso de la encapsulación de hidroxitirosol. Adicionalmente, se ensayarán modificaciones en las características estructurales de las emulsiones dobles abordadas, condicionando diversos aspectos relativos a distintos elementos del sistema. En este sentido, los esfuerzos se centrarán en el estudio de la fase lipídica (aumento de viscosidad) y de la fase acuosa externa (procesos de hidrogelificación). Estos diseños estructurales están encaminados a dotarlas de una composición y una consistencia de sólido (emulsiones

gelificadas) que favorezca su empleo como un sustituto de grasa animal excepcionalmente conveniente por la multifuncionalidad que aportan.

- II. **Evaluar la utilización de las emulsiones dobles y dobles estructuradas como estrategia de desarrollo de productos cárnicos funcionales.** En el marco de este objetivo se aplicarán procesos encaminados a reducir el contenido en grasa y mejorar su perfil de ácidos grasos en matrices cárnicas, en base a las recomendaciones sobre salud, así como a favorecer la presencia de hidroxitirosol. Para tal fin, se plantea la sustitución de la grasa animal, habitualmente empleada, por una emulsión doble estructurada (como sistema de entrega), conteniendo hidroxitirosol en su fase acuosa interna y altas concentraciones ácidos grasos poliinsaturados n-3 como el ácido α -linolénico (ALA) en la fase lipídica, aportada por la utilización de aceites vegetales ricos en ellos. Para realizar una apropiada valoración de su potencial aplicación, tales procesos de reformulación se llevarán a cabo en distintas matrices cárnicas como son: sistema modelo tipo/gel emulsión, salchichas tipo frankfurt y hamburguesas.

Para entender la naturaleza de los diferentes sistemas ensayados (emulsiones dobles/gelificadas y matrices cárnicas), así como las consecuencias de las distintas condiciones de procesado, formulación y/o conservación a que son sometidos, se realizarán estudios en diversos ámbitos. Según la naturaleza del sistema, dichos estudios considerarán, por un lado, aspectos asociados a su contribución nutricional/funcional, dado que una parte esencial del diseño realizado contempla que los análogos desarrollados contribuyan a dotar a los productos en los que se incorporen de distintas declaraciones nutricionales y de propiedades saludables dentro del marco legislativo europeo. Y por otro, abordarán su caracterización a nivel estructural, tecnológico, sensorial, microbiológico, entre otras, para establecer la idoneidad del proceso aplicado y la viabilidad de los productos obtenidos.

Materiales y Métodos

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Para una mejor comprensión, en esta sección se expondrán de manera resumida los materiales y métodos, así como el diseño experimental empleado para alcanzar los objetivos planteados en la presente memoria, y que se esquematiza en la **Figura 15**.

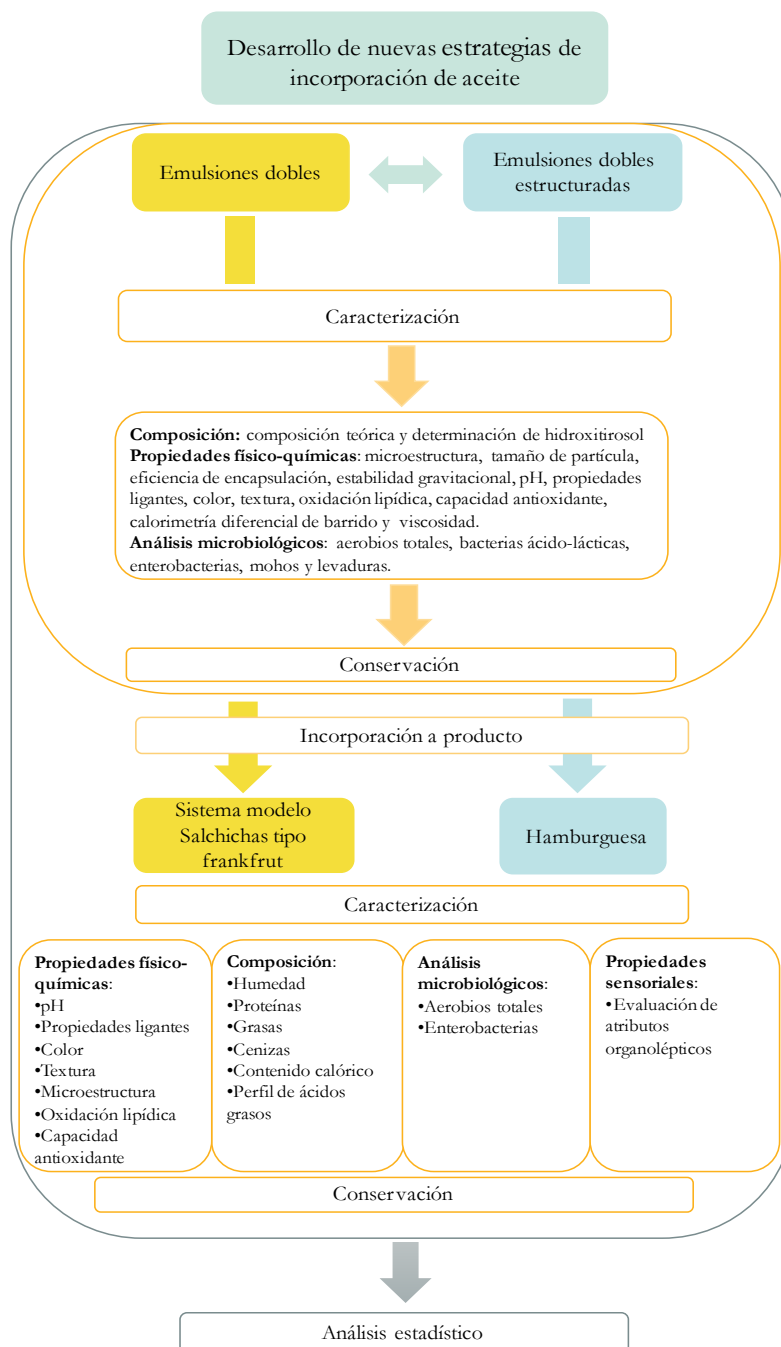


Figura 15. Esquema general del desarrollo experimental y de las características evaluadas.

3.1. MATERIAS PRIMAS

Para la preparación de las emulsiones dobles se ha utilizado como emulsionante hidrofílico el caseinato de sodio (NaCas) (Excellion EM 7, DMV Campina BV; Veghel, Holanda). Como emulsionante lipofílico se empleó el polirricinoleato de poliglicerol (PGPR) obtenido de Bavaro Chemicals S.L. (Sant Cebrià de Vallalta, España), y como fase lipídica distintos tipos lípidos: grasa de origen animal (filtrada) adquirida en el mercado local, aceite de oliva virgen extra (Carbonell, SOS Cuétara SA; Madrid, España), aceite de chía y de perilla (Grupo Nutracéutico Chiasa, SL. Valencia, España). Algunas de las emulsiones fueron formuladas conteniendo mono y di-glicéridos, aditivo E-471 (Verol CRS-10 y Verol CRS-50; Lasenor Emul S.L.; Barcelona, España) o hidroxitirosol (HXT) (Seprox Biotech; Madrid, España). En el proceso de estructuración de las emulsiones dobles además de los ingredientes previamente descritos se utilizó gelatina (tipo B, 200–220 bloom) de Manuel Riesgo, S.A. (Madrid, España) y transglutaminasa microbiana (TGM; Activa GS) de Ajinomoto Europe Sales GmbH, (Hamburgo, Alemania).

Para la preparación de los distintos productos cárnicos desarrollados en la presente tesis (sistema modelo tipo gel/emulsión, salchichas tipo Frankfurt y hamburguesas), se utilizó **carne magra y tocino de cerdo** que se adquirieron durante todo el estudio en un mercado local de Madrid. Manualmente se eliminó la grasa visible de la carne magra. Posteriormente ambos ingredientes cárnicos se sometieron a un picado a 6,0 mm y 4,5 mm, dependiendo del estudio, en una picadora (Mainca; Granollers, España) y se dividieron en lotes que se envasaron a vacío en bolsas de plástico (Cryovac BB3050). Tales lotes fueron congelados y almacenados en cámara de congelación (-20 ± 2 °C) hasta su utilización.

Adicionalmente se utilizó cloruro sódico (Panreac Química, SA; Barcelona, España), tripolifosfato sódico (Manuel Riesgo, SA; Madrid, España), nitrito sódico (Sigma-Aldrich Company Ltd, GmbH; Steinheim, Alemania) y saborizantes (Gewürzmüller, GmbH; Mönichingen, Alemania).

3.2. ELABORACIÓN DE LAS EMULSIONES

3.2.1. Emulsiones simples

Se elaboraron distintas emulsiones simples (ES) según la naturaleza del estudio (Apartado 4.1.3 y 4.2.1), las cuales, de manera resumida, se describen a continuación. En un homogeneizador de alimentos (Thermomix, Vorwerk, Alemania) que contiene una fase acuosa (W) constituida por NaCl, NaCas y HXT en agitación, se incorpora por goteo la fase lipídica formada por aceite de perilla y PGPR. Posteriormente se realiza dos pases en un homogeneizador de altas presiones (Panda Plus 1000, GEA NiroSoavi, Parma, Italia) de dos válvulas, en la primera se aplica una presión de 150 bar y en la segunda 35 bar (Figura 16).

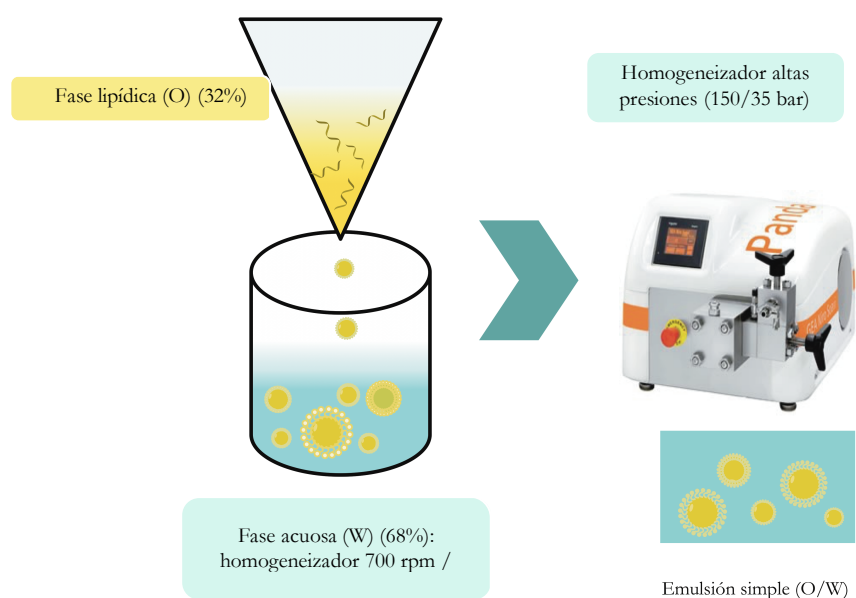


Figura 16. Esquema del proceso de elaboración de la emulsión simple descrito en el Apartado 4.1.3.

Así mismo, otra emulsión simple elaborada empleando distinta metodología fue utilizada en la reformulación de salchichas tipo frankfurt, (Apartado 4.2.1). Dicha emulsión fue preparada en un homogeneizador (Thermomix, Vorwerk, Alemania) donde se incorporaron 8 partes de agua y 1 parte de NaCas durante 30 segundos. Posteriormente, se añadió 10 partes de la fase lipídica, aceite de perilla, homogeneizándose durante 10 minutos más (Figura 17).

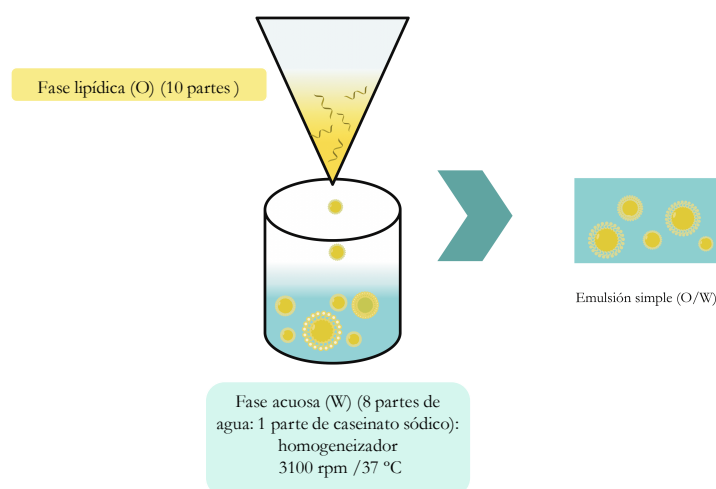


Figura 17. Esquema del proceso de elaboración de la emulsión simple estudiada en el Apartado 4.2.1.

3.2.2. Emulsiones dobles

La formación y caracterización de la emulsión doble (ED) han sido descritas en el Apartado 4.1.2 y 4.1.3. Este tipo de emulsión se empleó en la reformulación de salchichas tipo frankfurt y un sistema modelo gel/emulsión (Apartado 4.2.1 y 4.1.1). El proceso de obtención de la emulsión doble se describe brevemente a continuación (**Figura 18**).

Primero, se prepara la fase oleosa, constituida por distintos aceites vegetales (en función del tipo de estudio) o grasa animal filtrada, junto con el emulsionante lipofílico (PGPR) los cuales son homogeneizados a 60 °C. Mediante agitación se forma la emulsión primaria grosera (W_1/O) incorporando por goteo la fase acuosa interna, W_1 , (NaCl, NaCas y HXT, según el caso) a la fase lipídica. Esta emulsión grosera (tamaño de partícula elevado y heterogéneo) se pasa dos veces por un homogeneizador de altas presiones (Panda Plus 1000, GEA NiroSoavi, Parma, Italia) de dos válvulas, en la primera se aplica una presión de 550 bar y en la segunda una presión de 70 bar, obteniéndose así una emulsión simple del tipo W_1/O fina (tamaño de partícula inferior y más homogéneo).

A continuación, a la fase externa acuosa en agitación a 37 °C se le añade, poco a poco, la emulsión simple elaborada previamente para obtener una emulsión del tipo $W_1/O/W_2$ grosera. Una vez más, se vuelve a realizar dos pases por el homogeneizador (Panda Plus 1000) a 150/35 bar, obteniendo así una emulsión doble ($W_1/O/W_2$) final (**Figura 18**). Teniendo en cuenta los diferentes desarrollos realizados, la elaboración de estos sistemas puede presentar algunas modificaciones que se describen detalladamente en sus correspondientes apartados.

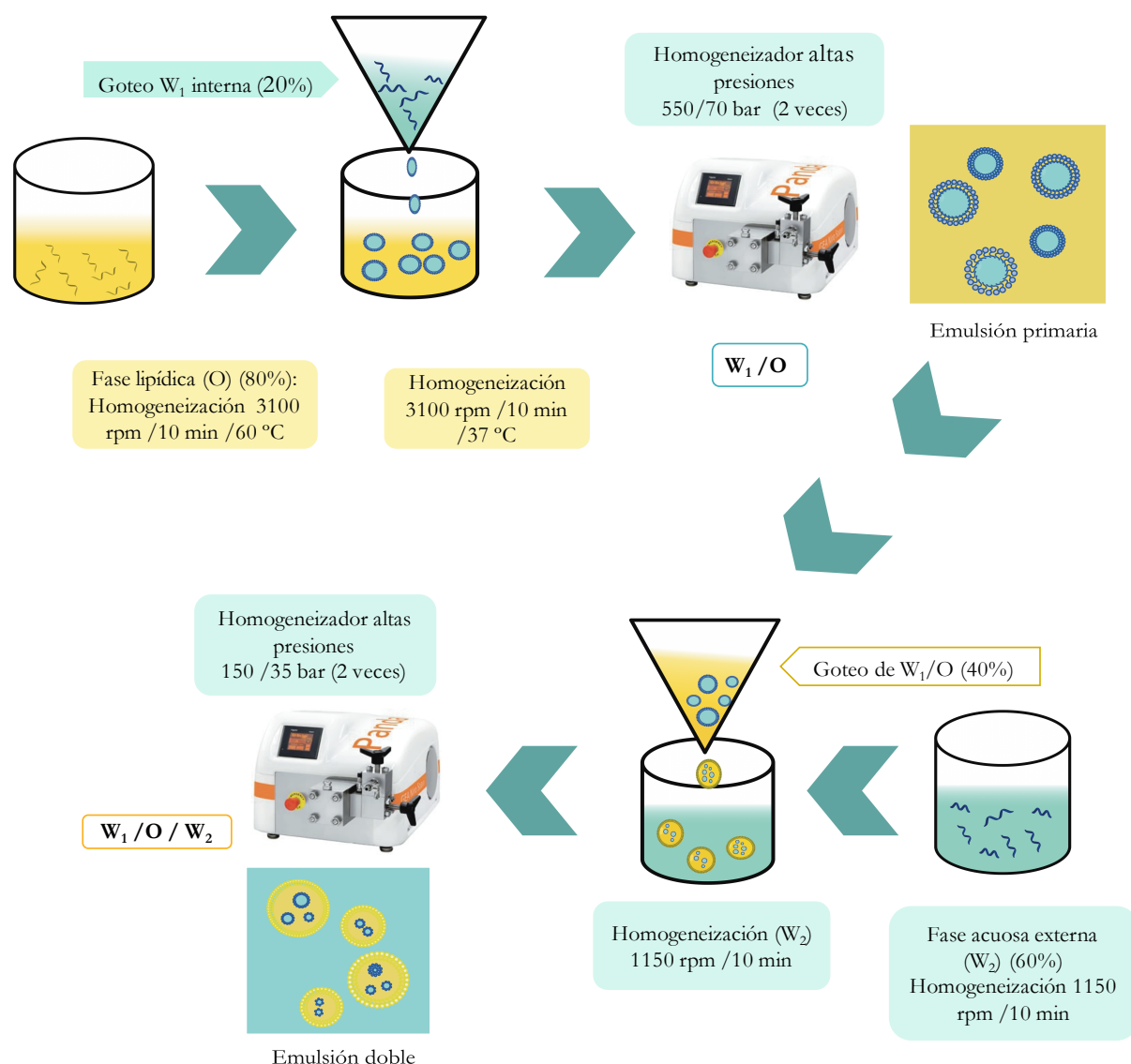


Figura 18. Descripción esquemática del proceso de elaboración general de las emulsiones dobles.

6.7.3. Emulsiones estructuradas

Para la obtención de las emulsiones dobles gelificadas (EDG), primero se elabora la emulsión doble como se describe en el apartado 4.2.2 para posteriormente continuar con la estructuración de la misma. Para ello se calienta la ED a 40 °C con suave agitación, incorporando a continuación gelatina (4%). Cuando está completamente disuelta, se baja la temperatura a 32 °C para posteriormente añadir la TGM (2%). Se agita suavemente hasta completa homogeneización e inmediatamente se alícuota en recipientes adecuados que se mantienen en refrigeración durante 24 h para que tenga lugar la formación del gel (**Figura 19**).

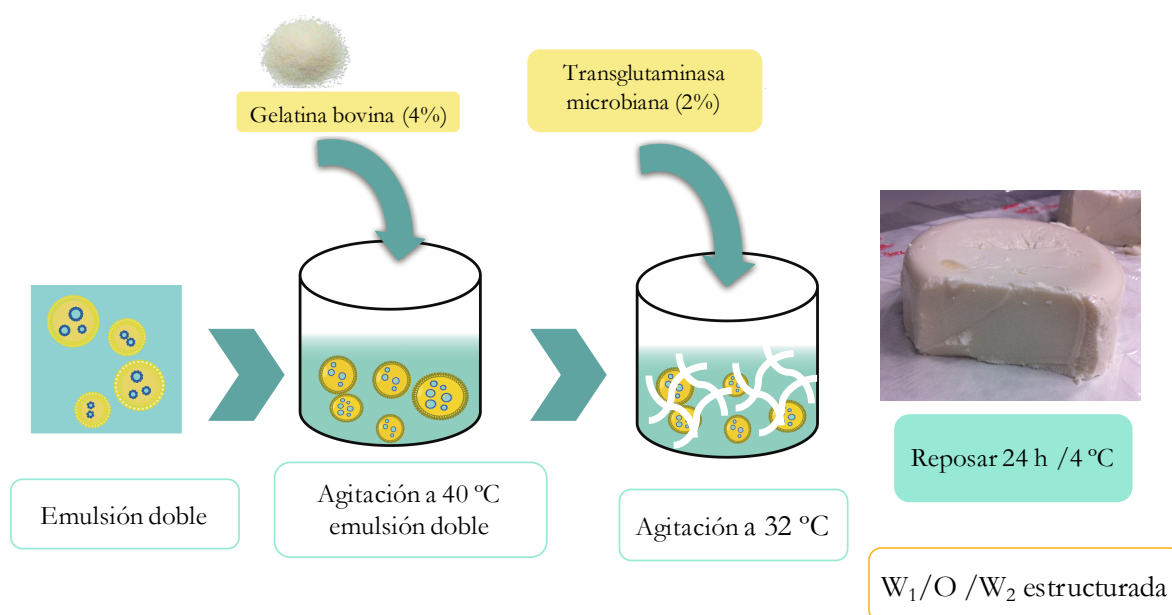


Figura 19. Descripción esquemática del proceso de la gelificación de las emulsiones dobles.

3.3. ELABORACIÓN DE PRODUCTOS CÁRNICOS

3.3.1. Sistema modelo y salchichas tipo frankfurt

Los sistemas modelo gel emulsión (Apartado 4.1.1) y las salchichas tipo frankfurt (Apartado 4.2.1) se pueden clasificar dentro de la gama de productos cárnicos del tipo gel/emulsión tratados por calor. Para la elaboración de estos productos, tanto la carne de cerdo como el tocino fueron descongelados durante 18 h a 2 ± 2 °C hasta alcanzar una temperatura entre -1 y -2 °C. Posteriormente se sometieron a picado y homogeneización en una picadora-homogeneizadora refrigerada a 2 °C (Stephan Universal Machine UM5; Hameln, Alemania). El proceso de elaboración es el siguiente: la carne fue homogeneizada durante 1 minuto, seguidamente se adicionaron la mitad de los ingredientes (incluidos el tocino o aceite vegetal o distintos sistemas emulsionados, agua y aditivos) que se mezclaron durante otro minuto.

Posteriormente se añadieron el resto de ingredientes, mezclándolos durante un min más, para finalizar con 2 minutos más de homogeneización en condiciones de vacío. Por consiguiente, el tiempo total de homogeneización fue de 5 minutos, garantizándose una temperatura final de la masa siempre por debajo de 12 °C. La mezcla cárnica obtenida se trasvasó a una embutidora manual (Mainca; Barcelona, España) para su embutición en tripas de celulosa de 20 mm de diámetro (Viscase SA; Bagnold Cedex, Francia). A continuación, se sometieron a

un tratamiento térmico en un horno ahumador a 80 °C (Unimatic 1000, Micro 40, Eller; Merano, Italia) hasta alcanzar 70 °C en el centro térmico. Al finalizar el proceso térmico los productos fueron sacados del horno y atemperados durante aproximadamente 15 minutos para ser almacenados en refrigeración ($2\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$) durante 14 h. Pasado este tiempo se eliminaron las tripas y se envasaron en bolsas (Cryovac BB3050) a vacío. Las salchichas se conservaron a $2\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ hasta sus análisis realizados durante la semana siguiente a su elaboración. Sin embargo, los sistemas modelo se almacenaron en refrigeración durante 39 días realizándose análisis a diferentes tiempos (**Figura 20**).

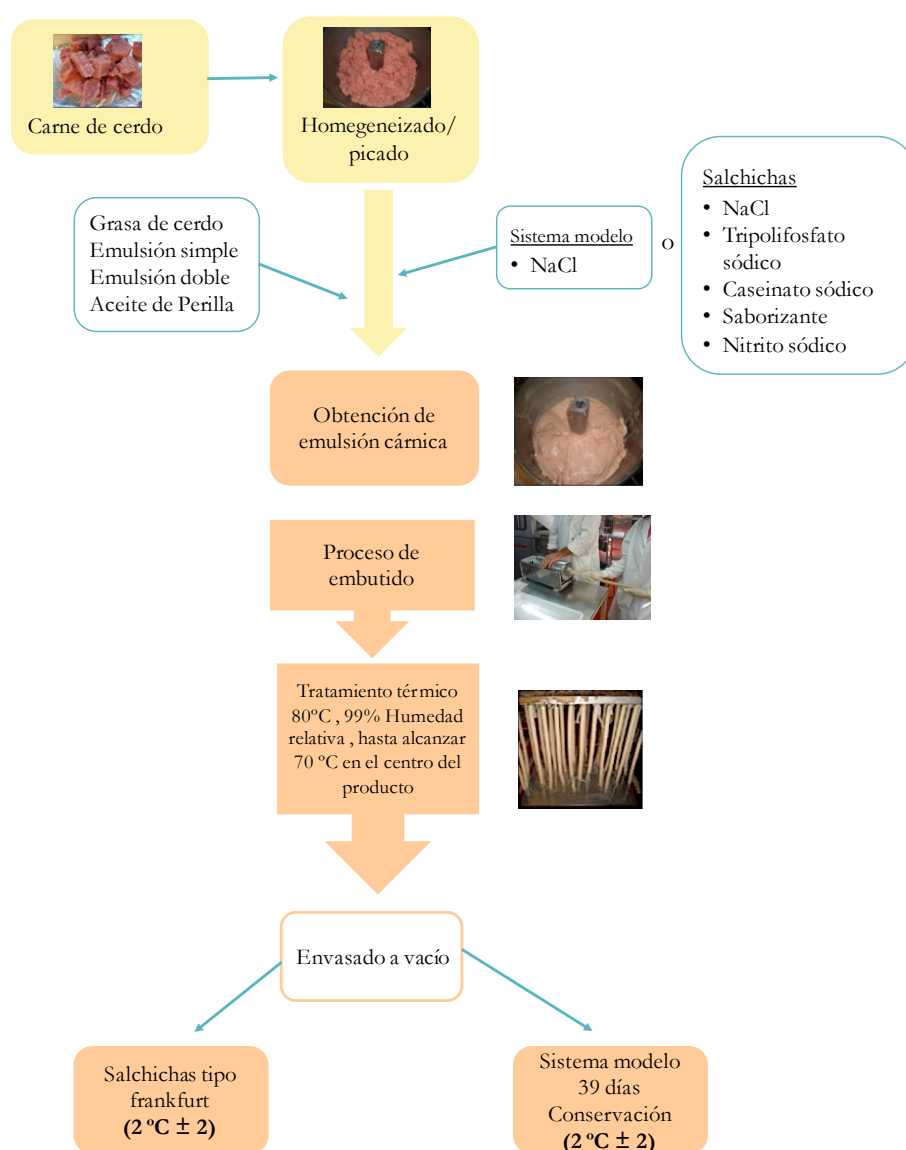


Figura 20. Descripción esquemática del proceso de elaboración del sistema modelo y de salchichas tipo frankfurt.

3.3.2. Hamburguesa

Las hamburguesas estudiadas en el Apartado 4.2.2 se elaboraron como se describe a continuación (**Figura 21**). La carne de cerdo y el tocino se descongelaron ($18 \text{ h a } 2 \pm 2^\circ \text{ C}$) antes de su uso. Inmediatamente, ambos ingredientes, y en su caso la emulsión gelificada, fueron picados a un tamaño de 4,5 mm (Vam. Dall. Srl. Modelo FTSIII; Treviglio, Italia). Seguidamente, la carne y la mitad de los ingredientes (incluidos el tocino y según el caso, la emulsión gelificada, cloruro de sodio y agua) se homogeneizaron en una mezcladora (Hobart N-506, Hobart MFG. Co., Troy, EEUU) durante 1 minuto. A continuación, se añadió el resto, mezclándose durante otro minuto. Las hamburguesas se moldearon en una formadora de hamburguesas manual, se envasaron en bandejas (EVOH/PP) y film (PET 12 μm , PP/EVOH/PP 70 μm ; ILPRA Systems España, S.L.), en atmósferas modificada (80% de O_2 y 20% de CO_2) y se conservaron a $2 \pm 2^\circ \text{ C}$ durante 14 días.

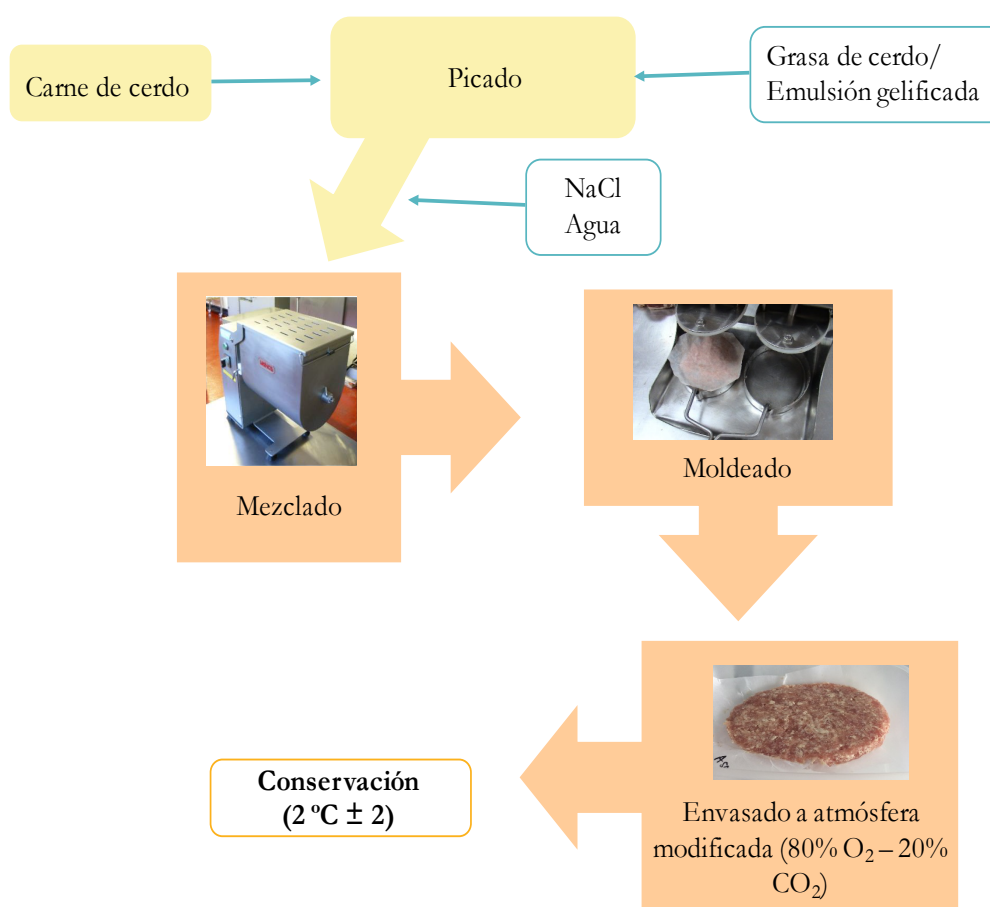


Figura 21. Descripción esquemática del proceso de elaboración de las hamburguesas.

3.4. CARACTERIZACIÓN DE LAS EMULSIONES

3.4.1. Composición

3.4.1.1. Contenido nutricional

En base a la formulación realizada se estimó el contenido de distintos compuestos en las emulsiones: proteína, agua, ácidos grasos, hidroxitirosol.

3.4.1.2. Determinación de Hidroxitirosol

La determinación de hidroxitirosol (HXT) en las emulsiones se realizó por cromatografía de líquidos de alta eficacia en un equipo con un inyector automático, bomba cuaternaria y detector de diodos (DAD). Se utilizó una columna Nucleosil 120 RP-18 (250 mm x 4,6 mm de diámetro x 5 ml), (Teknokroma), precedida por una precolumna de ODS. La cuantificación de HXT, se realizó aplicando un factor de corrección de 1,06 en las emulsiones gelificadas (por la adición de gelatina y TGM), empleando una curva de calibración estándar.

3.4.2. Propiedades físico-químicas

3.4.2.1. Microestructura

La morfología de las emulsiones se estudió mediante microscopía óptica (Riechert, Munich, Germany) a 40, 100 y 160 aumentos.

3.4.2.2. Distribución y tamaño de partícula

La distribución y tamaño de partícula de las emulsiones dobles y simples se evaluó por medio del analizador de partículas por difracción de láser Mastersizer S (Malvern Instrument Ltd, Worcestershire, UK) de acuerdo con la metodología descrita por Cofrades et al. (2013).

3.4.2.3. Eficiencia y estabilidad de la encapsulación

La eficiencia de encapsulación (EE) de los compuestos incluidos en la fase acuosa interna de las ED tras la elaboración y la estabilidad de encapsulación durante la conservación, se determinaron según la metodología de Sapei et al. (2012) y descrita en el correspondiente apartado (Apartado 4.1.3). Los resultados fueron expresados en porcentaje de compuesto bioactivo liberado por la emulsión primaria.

3.4.2.4. Estabilidad gravitacional y térmica

La estabilidad gravitacional (*creaming stability*) de las emulsiones simples y dobles se determinó mediante la separación de las fases acaecida durante su conservación en refrigeración según Bou et al. (2014).

La estabilidad térmica de la emulsión doble hidrogelificada (Apartado 4.1.4) se evaluó cuantificando las pérdidas de fluido como resultado del calentamiento de las mismas durante 30 min en baño de agua a 70 °C (Jiménez-Colmenero et al., 1995).

3.4.2.5. pH

Se midió en un pH-metro 827 Metrohm (Metrohm AG, Suiza) después de homogeneizar 10 g de EDG con 100 ml de agua destilada.

3.4.2.6. Medida instrumental del color

La evaluación del color se cuantificó en placas Petri en las emulsiones simples y dobles (Apartado 4.1.3) y sobre la superficie del corte transversal en las emulsiones dobles gelificadas (Apartados 4.1.3 y 4.1.4). La medida del color se realizó por el método de reflectancia mediante el sistema de coordenadas CIELab (Young y Whittle, 1985; CIE, 1995) utilizando un colorímetro CR-400 Chroma Meter (Konika Minolta Business Technologies, Inc, Tokio, Japón) en el Apartado 4.1.3 y un 3500d Chroma Meter (Konika Minolta Business Technologies, Inc, Tokio, Japón) en Apartado 4.1.4. Con ellos se determinaron los parámetros L^* , a^* y b^* , donde L^* representa la luminosidad (0 es negro y 100 blanco), a^* la tendencia al rojo (donde -60 es verde y +60 rojo) y b^* la tendencia al amarillo (donde -60 es azul y +60 amarillo).

3.4.2.7. Análisis del perfil de textura (TPA)

Para el análisis de la textura se empleó un texturómetro TA-XT.Plus (Texture Technologies Corp. Scarsdale, NY, EEUU). En las salchichas tipo frankfurt y las emulsiones dobles gelificadas se realizó un ensayo de perfil de textura (*Texture Profile Analysis*, TPA).

Este ensayo se basó en el procedimiento descrito por Bourne (1978) que consiste en una doble compresión axial de la muestra sin llegar a romperla, imitando el comportamiento mecánico de la masticación. Las EDG se prepararon como se describe en el Apartado 4.1.4, determinándose los siguientes parámetros:

- Dureza (*Hardness*, N): definida como la altura máxima en el registro obtenido en el primer ciclo de compresión. Este parámetro sirve para evaluar la fuerza máxima necesaria para producir una cierta deformación.
- Cohesividad (*Cohesiveness*, adimensional): calculada como la relación positiva entre el área de la segunda compresión respecto a la de la primera.
- Elasticidad (*Springiness*, mm): corresponde a la altura recuperada por la muestra tras la primera compresión.
- Masticabilidad (*Chewiness*, Nxmm): calculada como el producto de dureza, elasticidad y cohesividad.

3.4.2.8. Propiedades reológicas dinámicas

El análisis reológico se llevó a cabo en un reómetro de esfuerzo controlado (Bohlin CVO-100, Bohlin Instruments Ltd., Gloucestershire, Reino Unido). Todas las medidas se realizaron a 25 °C usando placas paralelas (20 mm diámetro, 1 mm abertura) protegiendo las muestras con una pequeña capa de vaselina (Codex purissimum, Panreac Química S. A. Barcelona, España) para impedir la pérdida de humedad. El control de temperatura se llevó a cabo mediante un sistema Peltier (Bohlin Instruments, Gloucestershire, Reino Unido). Los parámetros y metodología seguida para analizar el rango viscoelástico lineal, el barrido de frecuencia y barrido de temperatura calentando se encuentran descritos en los apartados 4.1.2 y 4.1.4. Los parámetros módulo elástico (G' , Pa), módulo viscoso (G'' , Pa) y ángulo de fase (δ°) se determinaron usando el software informático del equipo.

3.4.2.9. Viscosidad

La viscosidad de las fases oleosas de las emulsiones y de las DE se analizaron en un Bohlin CVO-100 (Bohlin Instruments Ltd., Gloucestershire, Reino Unido) a 25 °C y con un plato cónico CP1/60. Las condiciones de la medida se describen detalladamente en el Apartado 4.1.2. Los resultados se expresaron en Pa.s.

3.4.2.10. Calorimetría diferencial de barrido

Para el análisis de los puntos de fusión, así como las transiciones y cristalizaciones de las emulsiones dobles y aceites se utilizó un microcalorímetro diferencial de barrido (modelo TA-Q1000, TA Instrument, New Castle, DE, EE.UU). La metodología se describe en el Apartado 4.1.2 de la presenta memoria. Los puntos de temperatura y las entalpías de transición se calcularon por integración de la línea base.

3.4.2.11. Oxidación lipídica

3.4.2.11.1. Índice de hidroperóxidos (IH)

El índice de hidroperóxidos como medida de determinación de productos primarios de la oxidación, se llevó a cabo siguiendo la metodología de Matalanis et al. (2012) con algunas modificaciones (Apartado 4.1.3 y 4.1.4). La concentración de hidroperóxidos se calculó empleando una curva de calibración preparada con hidroperóxido de cumeno (Sigma Chemical Co.; St. Louis, MO, EEUU). Los resultados se expresaron en mmoles de hidroperóxido por kg de muestra.

3.4.2.11.2. Productos secundarios de la oxidación

La formación de productos secundarios de la oxidación se determinó mediante la determinación de malonaldehído y de TBARS. El contenido de malonaldehído en las emulsiones líquidas y estructuradas del Apartado 4.1.3 se determinó por cromatografía líquida de alta eficacia según Mateos et al. (2004). La concentración de TBARS por espectrofotometría de ultravioleta-visible por la metodología descrita por Serrano et al. (2006). Los resultados se calcularon en una curva de calibración (específica en cada caso), expresándose en mg de malonaldehído por kg de muestra.

3.4.2.12. Determinación de capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante de los distintos sistemas formulados fue determinada empleando distintas metodologías en función de la naturaleza del sistema o del objetivo del trabajo.

3.4.2.12.1. Ensayo de potencial reductor férrico FRAP (*Ferric reducing/antioxidant power*)

La capacidad antioxidante medida por FRAP determina el poder reductor de las ES, ED y EDG (Apartado 4.1.3 y 4.1.1) al reducir el complejo tripiridiltriazina (TPTZ) con Fe (III) a la forma ferrosa [Fe (II)], según Cofrades et al. (2011). Los resultados fueron extrapolados a su correspondiente recta de calibrado descrita detalladamente en cada apartado y expresados por $\mu\text{moles Fe(II)/g}$ de muestra.

3.4.2.12.2. Método del DPPH•

La actividad antioxidante de las ED se midió en base a la actividad de captación del radical libre 1,1-difenil-2-picrilhidracil (DPPH•) estable según Sanchez-Muniz et al. (2012) (Apartado 4.1.3). Los resultados se expresaron por porcentaje de inhibición.

3.4.2.12.3. Método fotoquimioluminiscente

La actividad antioxidante de las EDG (Apartado 4.1.4) se determinó según Cofrades et al. (2011). Este se basa en la generación fotoquímica controlada de radicales, parte de los cuales son disipados por el antioxidante y los restantes cuantificados por una reacción sensible de detección de quimioluminiscencia. Los resultados fueron expresados por mmol de equivalente de trolox/g de muestra.

3.4.3. Análisis microbiológico

Se determinaron aerobios totales, bacterias ácido-lácticas, mohos y levaduras en las EDG (Apartado 4.1.4). Los resultados fueron expresados por logaritmo de unidades formadoras de colonia por g de muestra ($\log \text{ufc/g}$).

3.5. CARACTERIZACIÓN DE LOS PRODUCTOS CÁRNICOS

3.5.1. Composición

3.5.1.1. Componentes mayoritarios

La determinación de humedad y cenizas se realizó según los métodos descritos por la AOAC (2005). La cantidad de proteína se evaluó mediante un analizador automático de nitrógeno (LECO FP-2000, Leco Corporation, St Joseph, MI, EEUU) tras multiplicar al nitrógeno obtenido por el factor de conversión de 6,25. El contenido en grasa se analizó siguiendo el método descrito por Bligh y Dyer (1959).

El contenido energético fue estimado utilizando los factores de conversión de 9,1 kcal/g para la grasa y 4,1 kcal/g para la proteína e hidratos de carbono.

3.5.1.2. Perfil de ácidos grasos

Primeramente, se realizó una extracción de grasa como se describe en el Apartado **3.5.1.1**, de las salchichas tipo frankfurt y de las hamburguesas (Apartado **4.1.3** y **4.2.2**) Posteriormente la obtención de los ésteres metílicos (FAME) se realizó según Sanchez-Muniz et al. (1998) empleando tefloruro de boro/metanol. En las salchichas tipo frankfurt el perfil de ácidos grasos se realizó según López-López et al. (2009) analizando y cuantificando los ésteres metílicos con un cromatógrafo de gases (Shimadzu, Modelo GC-2014; Kyoto, Japón) equipado con una columna capilar SPI2330 (60 m x 0,25 mm x 0,2 mm) (Supelco, Inc; Bellefonte, EEUU) y un detector de ionización de llama. En hamburguesas se estudió según el procedimiento descrito por Lee et al. (2012) y cuantificando los ésteres metílicos a través de un cromatógrafo de gases (Shimadzu, Modelo 7820A, CA-EEUU) con una columna capilar SPI2330 (60 m x 0,25 mm x 0,2 mm) (Supelco, Inc; Bellefonte, EEUU) y un detector de ionización de llama. En ambos casos como patrones de referencia para su identificación se empleó una mezcla de estándar FAME Mix y Animal source FAMES (47015-U) (Supelco, Alltech Associated, Inc. Deerfield, IL, EEUU). Los resultados se expresaron como mg de ácido graso/100 g de FAME.

3.5.2. Propiedades físico-químicas

3.5.2.1. Microestructura

La microestructura de las salchichas tipo frankfurt (Apartado 4.2.1) se determinó mediante microscopía electrónica de barrido (Scanning Electron Microscopy, SEM, Jeol, JSC 6400; Tokio, Japón) siguiendo la metodología propuesta por Jiménez-Colmenero et al. (1995).

3.5.2.2. Propiedades ligantes de agua y grasa

Se midieron pérdidas de peso (grasa y agua) en las salchichas, en función del tratamiento ensayado. Los resultados fueron expresados en porcentaje respecto al peso inicial del producto.

3.5.2.2.1. Pérdidas durante el procesado

Las pérdidas durante el procesado de las salchichas (Apartado 4.2.1) se calcularon como la suma de las pérdidas de peso durante el tratamiento térmico y el almacenamiento en refrigeración durante la primera noche.

3.5.2.2.2. Estabilidad térmica.

Se determinó la estabilidad térmica en las salchichas (Apartado 4.2.1) con la misma metodología descrita en el Apartado 3.4.2.4.

3.5.2.3. pH

En los productos cárnicos se analizó el pH como se detalla en el Apartado 3.4.2.5.

3.5.2.4. Medida instrumental del color

La evaluación del color se determinó sobre la superficie del corte transversal en las salchichas (Apartado 4.2.1) en un colorímetro CR-400 Chroma Meter (Konika Minolta Business Technologies, Inc, Tokio, Japón) siguiendo la misma metodología descrita en el Apartado 3.4.2.6.

3.5.2.5. Determinación instrumental de la textura

3.5.2.5.1. Análisis del perfil de textura (TPA)

Las salchichas se prepararon y analizaron como se describe en el Apartado 4.2.1, siguiendo la metodología detallada en el Apartado 3.4.2.7.

3.5.2.5.2. Test de Kramer (KSF)

El test de Kramer se realizó en hamburguesas (Apartado 4.2.2). La fuerza de corte Kramer (Kramer shear force, KSF) se determinó utilizando una célula de Kramer, como se describe en dicho apartado. Los resultados se expresaron como la fuerza máxima por unidad de peso de muestra (N/g).

3.5.2.6. Oxidación lipídica

3.5.2.6.1. Índice de hidroperóxidos (HP)

El índice de hidroperóxidos en las hamburguesas (Apartado 4.2.1) se determinó siguiendo la metodología descrita en el Apartado 3.4.2.11.1.

3.5.2.6.2. Determinación de las sustancias reactivas con el ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS)

La formación de productos secundarios de la oxidación en todos los productos cárnicos fue analizada mediante la determinación de TBARS detallada en el Apartado 3.4.2.11.2.

3.5.2.7. Determinación de capacidad antioxidante

3.5.2.7.1. Método del DPPH•

La actividad antioxidante cuantificada por DPPH• de los sistemas modelo (Apartado 4.1.1) se determinó como se detalla en al Apartado 3.4.2.12.2.

3.5.2.7.2. Método por fotoquimioluminiscencia

La capacidad antioxidante de las hamburguesas (Apartado 4.2.2) se analizó como se describe en el Apartado 3.4.2.12.3.

3.5.3. Análisis microbiológico

En las hamburguesas se determinaron aerobios totales, bacterias ácido-lácticas y enterobacterias (Apartado 4.2.2). Los resultados fueron expresados por logaritmo de unidades formadoras de colonia por g de muestra (log ufc/g).

3.5.4. Análisis sensorial

El análisis sensorial, específico para cada producto cárnico, se llevó a cabo para evaluar sus propiedades organolépticas y comparar su grado de aceptación frente a los respectivos controles. La selección de los catadores se realizó entre personal del centro de investigación familiarizado con el consumo de estos productos y atributos a evaluar, siendo el número de panelista igual o superior a 19. En todos los análisis se realizó una prueba en la que los catadores puntuaban los diferentes parámetros en una escala hedónica no estructurada de 0 a 10 sin extremos fijos. Los atributos evaluados y su procedimiento de preparación son descritas en cada una de los apartados correspondientes a cada estudio (Apartados 4.2.1 y 4.2.2).

3.5.5. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados se realizó empleando el programa SPSS Statistics 22 (SPSS Inc; Chicago, IL, EEUU). Para determinar el efecto de la formulación sobre los diferentes parámetros estudiados, se realizó un análisis de la varianza (*Analysis of variance*, ANOVA) de una vía. Para determinar las diferencias entre grupos se utilizó la prueba “post hoc” de Tukey (*Honest Significant Difference*, HSD). Cuando el objetivo fue establecer el efecto de las diferentes formulaciones y el tiempo de conservación sobre los parámetros medidos se utilizó un ANOVA de dos vías (formulación y tiempo) y se empleó la prueba de Tukey HSD para determinar las diferencias entre grupos. También se realizó un análisis de componentes principales (PCA) para el análisis estadístico de los valores de los atributos del análisis sensorial de las hamburguesas empleando software XLSTAT2009.4.03 (Addinsoft, Barcelona, España).

Resultados

Tabla 1. Resumen de las publicaciones presentes en el manuscrito

Título	Revista	Objetivo/Consideraciones	Conclusiones
Apartado 4.1. Desarrollo y obtención de emulsiones dobles como sistemas de entrega de compuestos bioactivos que puedan emplearse como análogos de grasa			
4.1.1. Oxidative stability of meat systems made with W1/O/W2 emulsions prepared with hydroxytyrosol and chia oil as lipid phase.		Estudiar la posibilidad de usar emulsiones dobles W ₁ /O/W ₂ como ingredientes alimentarios para optimizar la presencia de compuestos bioactivos en productos cárnicos.	Las emulsiones dobles ofrecen nuevas posibilidades para incorporar ingredientes funcionales en alimentos como los productos cárnicos.
4.1.2. Olive oil based edible W/O/W emulsions stability as affected by addition of some acylglycerides.		Inducir la cristalización del aceite en la fase lipídica de la emulsión (W/O/W) mediante la adición de mono y diglicéridos, ayudando así a estabilizar la fase lipídica. los alimentos.	La adición de mono y diglicéridos induce a la cristalización de la fase lipídica, ofreciendo la posibilidad de su utilización en productos cárnicos.
4.1.3. Comparison of simple, double and gelled double emulsions as hydroxytyrosol and n-3 fatty acid delivery systems.		Caracterización de tres sistemas de liberación controlada basados en emulsiones (emulsión simple, emulsión doble y emulsión doble gelificada).	Las emulsiones dobles gelificadas ofrecen ventajas interesantes como sistemas de liberación controlada, así como propiedades plásticas adecuadas para incorporación de productos cárnicos.
4.1.4. Technological characteristics of cold-set gelled double emulsion enriched with n-3 fatty acids: Effect of hydroxytyrosol addition and chilling storage.		Caracterizar a nivel tecnológico y microbiológico las dobles emulsiones gelificadas elaboradas con aceite de perilla e hidroxitirosol encapsulado.	El proceso de gelificación conlleva a obtención de emulsiones gelificadas con estructura sólida a temperatura ambiente y adecuadas características tecnológicas.
Apartado 4.2. Utilización de emulsiones dobles y dobles gelificadas como estrategia de desarrollo de productos cárnicos funcionales			
4.2.1. Double emulsions to improve frankfurter lipid content: impact of perilla oil and pork backfat.		Desarrollo de productos salchichas tipo frankfurt con perfil lipídico mejorado al sustituir totalmente de grasa animal por emulsión doble elaborada con aceite rico en n-3.	La incorporación de dobles emulsiones fue satisfactoria tecnológicamente, abriendo la posibilidad de desarrollar alimentos funcionales.
4.2.2. Gelled emulsions as delivery systems for hydroxytyrosol and n-3 fatty acids in healthy pork patties.		Desarrollo de hamburguesas con perfil lipídico mejorado al sustituir la grasa animal por emulsión doble gelificada elaborada con aceite rico en n-3.	La sustitución de grasa animal por los análogos de grasa no conllevó a problemas tecnológicos, obteniéndose productos con perfil lipídico saludable y propiedades funcionales.

APARTADO 4.1.

Desarrollo de análogos de grasa
basados en emulsiones estructuradas:
emulsión doble y emulsión doble
gelificada

APARTADO 4.1.1.

ARTÍCULO 1

Oxidative stability of meat systems made with W1/O/W2 emulsions prepared with hydroxytyrosol and chia oil as lipid phase

Cofrades, S., Santos-López, J. A., Freire, M., Benedí, J., Sánchez-Muniz, F. J. and Jiménez-Colmenero, F. (2014). LWT - Food Science and Technology **59**(2): 941-947



Oxidative stability of meat systems made with $W_1/O/W_2$ emulsions prepared with hydroxytyrosol and chia oil as lipid phase

S. Cofrades ^{a,*}, J.A. Santos-López ^b, M. Freire ^a, J. Benedí ^b, F.J. Sánchez-Muniz ^c,
F. Jiménez-Colmenero ^a

^a Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos y Nutrición (ICTAN-CSIC), Madrid, Spain

^b Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

^c Departamento de Nutrición y Bromatología I (Nutrición), Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 January 2014

Received in revised form

30 April 2014

Accepted 26 June 2014

Available online 3 July 2014

Keywords:

Double emulsions

Hydroxytyrosol

Chia oil

Lipid oxidation

Meat system

ABSTRACT

The aim of this paper was to evaluate the oxidative stability of healthier lipid cooked meat systems (MS) in which pork backfat was replaced by a double emulsion (DE, $W_1/O/W_2$) prepared with hydroxytyrosol (HXT) within an inner aqueous phase and chia oil as lipid phase. Physical characteristics of DEs and oxidative stability of DEs and MS during chilled storage were analysed. In DEs, which were highly stable, the presence of HXT improved oxidative stability, increasing ($P < 0.05$) DPPH free radical scavenging and ferric reducing ability (FRAP) and reducing ($P < 0.05$) levels of thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS). In MS, replacement of pork backfat by chia oil promoted lipid oxidation, which was more pronounced when chia oil was incorporated in the DE than when it was added in liquid form. HXT demonstrated antioxidative capacity, although it was less efficient when incorporated as part of a $W_1/O/W_2$ emulsion. In conclusion, MS including DE formulated with chia and HXT display oxidative stability throughout their commercial life, assuring successful development of potential healthier meat products.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Multiple (or double) emulsions are multi-compartmentalized systems in which oil-in-water (O/W) and water-in-oil (W/O) coexist, where the globules of the dispersed phase themselves contain even smaller dispersed droplets (Garti, 1997). The most common forms are water-in-oil-in-water ($W_1/O/W_2$). Double emulsions (DE) can be used to improve the lipid characteristics of foods by reducing fat content or providing healthier fatty acid profiles (Jiménez-Colmenero, 2013). Although some technological strategies for improving fat content in meat products are available (Jiménez-Colmenero, 2007), the replacement of animal fats normally present in some foods (for example meat products) with DEs formulated with healthier lipid profile oils opens up new prospects for the development of potentially functional foods.

Interest in Chia (*Salvia hispanica* L.) oil has grown recently, since it is very rich in α -linolenic acid, contains relatively low levels of saturated fatty acids and does not contain any of the antinutritional compounds or vitamin B₆ antagonist factors present in other

sources of α -linolenic acid (Ayerza & Coates, 2005). Diets enriched with chia oil increase high density lipoprotein (HDL) and n-3 polyunsaturated fatty acids (n-3 PUFA) and reduce cholesterol in rat serum (Ayerza & Coates, 2005).

Prevention of lipid oxidation is a prerequisite for successful development of foods enriched with lipids containing n-3 PUFAs. Due to safety and toxicity problems with synthetic antioxidants, there is increasing interest in natural compounds to delay the oxidation process in meat and to act as an antioxidant in the body, thus reducing the risk of various diseases related to the production of free radicals (Bastida et al., 2009). Olive oil's phenolic compounds, such as hydroxytyrosol (HXT, 3,4-dihydroxyphenylethanol), have attracted much attention because of their technological advantages (e.g. they enhance food lipid stability) and beneficial health properties (Medina, Lois, Alcantara, Lucas, & Morales, 2009). HXT can be used as a functional food ingredient, especially in PUFA-enriched foods, including meat products (Cofrades et al., 2011; DeJong & Lanari, 2009). DEs have been used to encapsulate bioactive compounds and would be of interest in the case of antioxidants in PUFA-enriched DEs (Jiménez-Colmenero, 2013). Although chia oil has been used as a lipid phase in the primary emulsion to improve the lipid profile of $W_1/O/W_2$ emulsions (Carrillo-Navas et al., 2012), as far as the authors are aware there have been no studies on the

* Corresponding author. Tel.: +34 91 549 23 00; fax: +34 91 549 36 27.

E-mail addresses: scofrades@ictan.csic.es, scofrades@if.csic.es (S. Cofrades).

Table 1
Formulation of $W_1/O/W_2$ emulsions, control (DE/C) and containing hydroxytyrosol (DE/HXT).

Denomination		Inner aqueous phase (W_1)	Lipid phase (O)	Outer aqueous phase (W_2)
DE/C	Component	NaCl 0.6 g/100 g + SC 0.5 g/100 g	Chia oil 94 g/100 g + PGPR 6 g/100 g	NaCl 0.6 g/100 g + SC 0.5 g/100 g
	Ratio	20 g/100 g 40 g/100 g (W_1/O)	80 g/100 g	60 g/100 g
DE/HXT	Component	NaCl 0.6 g/100 g + SC 0.5 g/100 g + HXT 100 mg/100 g	Chia oil 94 g/100 g + PGPR 6 g/100 g	NaCl 0.6 g/100 g + SC 0.5 g/100 g
	Ratio	20 g/100 g 40 g/100 g (W_1/O)	80 g/100 g	60 g/100 g

NaCl, sodium chloride; SC, sodium caseinate; PGPR, polyglycerol polyricinoleate; HXT, hydroxytyrosol.

encapsulation process of HXT in PUFA-enriched DEs and their use in healthier-lipid meat product formulation.

This paper considers the possibility of using $W_1/O/W_2$ emulsions as intermediate products (food ingredients) to optimize the presence of bioactive compounds in meat systems. The objectives of the paper were: a) to prepare a $W_1/O/W_2$ emulsion including HXT in the inner aqueous phase and using chia oil as lipid phase; b) to examine the capacity of HXT to inhibit lipid oxidation in these α -linolenic acid-enriched double emulsions; and c) to evaluate the antioxidant activity of HXT in healthier-lipid meat matrices in which animal fat (pork backfat) was replaced by these DEs. The effect in these meat systems was compared to direct addition of HXT and liquid chia oil.

2. Material and methods

2.1. Formulation and preparation of $W_1/O/W_2$ emulsions

Chia oil (Grupo Nutraceutico Chiasa, S.L. Valencia, Spain) used for DE preparation, contained (according to supplier), 18.5–21 g/100 g linoleic, 57–65 g/100 g α -linolenic and between 20 and 25 g/100 g of palmitic, stearic and oleic acids, giving a total of approximately 85 g/100 g of PUFA.

The $W_1/O/W_2$ emulsions (Table 1) were prepared following a two-step emulsification process as described by Cofrades, Antoniou, Solas, Herrero, and Jiménez-Colmenero (2013), with slight modifications. Briefly, in the first step, a primary emulsion (W_1/O) was made. An oil phase was prepared by dispersing 6 g/100 g of the lipophilic surfactant PGPR (polyglycerol ester of polyricinoleic acid-SUGIN 476/M, Cargill S.L.U. Spain) in chia oil and heating to 60 °C/15 min in a TM-31 model Thermomix food processor (Vorwerk, Germany) at setting 3 (700 rpm). Two coarse emulsions were prepared by drop-wise addition of 20 g/100 g of the inner aqueous phase W_1 containing 0.6 g/100 g NaCl (Panreac Química SA, Barcelona, Spain) and 0.5 g/100 g sodium caseinate (DMV Excellion EM 7, DMV Campina B.V. Veghel, The Netherlands), without and with 100 mg/1000 g of HXT (Seprox Biotech S.L., Madrid, Spain), to 80 g/100 g of oil phase (Table 1). The W_1/O emulsions were pre-emulsified in a blender (Thermomix, Vorwerk, Germany) at 3250 rpm for 5 min 30 s at 50 °C and the resulting coarse emulsions were passed twice through a two-stage high pressure homogenizer (GEA Niro Soavi model Panda Plus 2000, Parma, Italy) at 7977/1015 psi (first-stage pressure/second-stage pressure). The emulsions were then allowed to cool at room temperature before use. In the second step, the $W_1/O/W_2$ emulsions were prepared by gradually adding each W_1/O emulsion (40 g/100 g) to an outer aqueous phase W_2 (60 g/100 g) (with 0.6 g/100 g NaCl and 0.5 g/100 g sodium caseinate) followed by mixing in a Thermomix blender for 5 min 30 s at 700 rpm at room temperature. The resulting coarse emulsions were passed twice through a two-stage high-pressure homogenizer at 2175/435 psi. Multiple emulsions were divided into two parts. One part was used for characterization of the emulsions;

for this purpose 10 mL aliquots of each sample were stuffed into graduated 15 mL plastic tubes and analysed after overnight storage at 4 °C and kept under chilled storage (4 °C) and analysed at 1st, 3rd, 7th and 10th days. The other part was used for the formulation of MS. Both $W_1/O/W_2$ emulsions (with and without HXT) were prepared in duplicate.

2.2. Meat system design and preparation

The meat systems (MS) were designed to achieve the same fat level (11.4 g/100 g), using similar amounts of lean meat (and therefore of muscle protein content 15 g/100 g). Fat improvement was done basically by replacing pork backfat with the same proportion of chia oil, as liquid oil or as the lipid phase of DEs prepared previously (Table 2). Five MS were prepared (Table 1). The concentration of HXT was selected on the basis of studies demonstrating antioxidant efficiency in oil-in-water emulsions and MS (Cofrades et al., 2011).

Fresh post-rigour raw pork (mixture of *M. biceps femoris*, *M. semimembranosus*, *M. semitendinosus*, *M. gracilis* and *M. adductor*) and pork backfat were obtained from a local market. The meat and pork backfat were passed through a grinder with a 0.6 cm plate (Mainca, Granollers, Spain). Lots of approx. 500 g were vacuum packed and frozen (at −18 °C) until use. For meat batter preparation, the meat and fat were thawed for about 18 h at 2 ± 2 °C up to a temperature between −1 and −2 °C. The meat was homogenized for 1 min in a grinder homogenizer connected to a cooling bath (2 °C) (Stephan Universal Machine UM5, Stephan u. Söhne GmbH and Co., Hameln, Germany). Half of the fat or fat replacers (depending on the formulation), sodium chloride and water were added and mixed for 1 min. Then the remaining half of the

Table 2
Meat batter formulation (g/100 g).

Sample denomination	Meat	Pork backfat	Chia oil	DE/C	DE/HXT	Added water	HXT
MB/C	70	9.0	—	—	—	19.0	—
MB/LO	70	—	8.4	—	—	19.6	—
MB/LO/HXT	70	—	8.4	—	—	19.6	100 mg/1000 g (in added water)
MB/DE/C	70	—	—	28.0	—	—	—
MB/DE/HXT	70	—	—	—	28.0	—	100 mg/1000 g (in $W_1/O/W_2$ +HXT)

Sample denomination: MB/C meat batter (control) formulated with pork backfat; MB/LO meat batter formulated by replacing animal fat with liquid chia oil; MB/LO/HXT meat batter formulated by replacing animal fat with liquid chia oil and including hydroxytyrosol (HXT, 100 mg/1000 g) dissolved in water; MB/DE/C meat batter formulated by replacing animal fat with the double emulsion prepared with chia oil as lipid phase (DE/C, see Table 1); MB/DE/HXT meat batter formulated by replacing animal fat with the double emulsion prepared with chia oil as lipid phase and encapsulated HXT (DE/HXT, see Table 1). All samples containing 2 g/100 g of NaCl.

ingredients was added and the whole homogenized for 1 min. The final mass was homogenized in a vacuum for 2 min. The final temperature was below 12 °C in all cases.

A stuffer (Mainca, Barcelona, Spain) was used to stuff the resulting meat batter into 20 mm diameter NOJAX cellulose casings (Viscase S.A. Bagnold. Cedex, France). The stuffed batters were heated in a smokehouse (model Unimatic 1000, Micro 40, Eller, Merano, Italy) until the thermal centre of the product reached 70 °C. Once the thermal treatment was completed, the samples were tempered (30 min at room temperature) and then stored under refrigeration (2 ± 2 °C) overnight. Products were vacuum packaged (Cryovac® BB3050), kept in chilled storage (4 °C) and analysed on the 1st, 7th, 19th, 28th and 39th days. Two batches were made for each type of MS.

2.3. $W_1/O/W_2$ emulsion characterization

2.3.1. Particle size measurement and storage stability

The particle size and oil droplet distribution in DEs were determined with a Malvern Mastersizer S laser diffraction particle size analyser (Malvern Instruments Ltd, Worcestershire, U.K.) equipped with a He–Ne laser ($\lambda = 633$ nm) as reported by Cofrades et al. (2013). Volume mean diameter values ($D_{4,3}$) and the percentage of volume corresponding to each observed population were averages of at least three measurements.

The gravitational separation (creaming) of DEs was recorded over storage time at 4 °C in terms of phase separation and expressed as % of initial sample height. This parameter was determined in triplicate.

2.3.2. Microscopy

Light microscopy (Reichert, Munich, Germany) was used to examine DE morphology. Samples were placed on microscope slides and gently covered with a coverslip. The images included are a representative selection from a large number of images that were taken of the microstructure of the DEs.

2.3.3. DPPH free radical scavenging

The antioxidant activity of the extracts was measured on the basis of the scavenging activity of the stable 1, 1-diphenyl 2-picrylhydrazyl (DPPH) free radical according to Sánchez-Muniz et al. (2012) with slight modifications. 1 g of sample was homogenized for 30 s in 50 mL of methanol (Panreac Química S.A., Barcelona, Spain). 1 mL of the extract was mixed with 4 mL of DPPH (Sigma–Aldrich Co., St. Louis, Missouri, USA) in methanol 0.005 mg/mL. The mix of 1 mL methanol and 1 mL DPPH solution was used as control. The reaction was carried out in triplicate and the absorbances (Abs) were measured at 517 nm after 30 min with an absorbance plate reader (Fluostar optima, BMG Labtech, Ortenberg, Germany). The % inhibition was calculated by the following equation.

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{\text{Abs}_{\text{c}} - \text{Abs}_{\text{s}}}{\text{Abs}_{\text{c}}} \times 100$$

where $\text{Abs}_{\text{control}}$ is the absorbance of the control and $\text{Abs}_{\text{sample}}$ is the absorbance of the sample.

2.3.4. Ferric reducing antioxidant power assay

Ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays were performed as reported by Cofrades et al. (2011) with slight modifications. Briefly, 30 μL of extract, 900 μL of FRAP reagent and 90 μL of distilled water were mixed. FRAP reagent is prepared daily and contains 25 mL of acetate buffer pH 3.6, 2.5 mL of TPTZ (2,4,6-Tri(2-pyridyl)-s-triazine, Sigma–Aldrich Co., St. Louis, Missouri, USA), [3.12 g/L] in hydrochloric acid [1.2 mL/L] and 2.5 mL of ferric

chloride hexahydrate (Sigma–Aldrich Co., St. Louis, Missouri, USA) [5.4 mg/mL]. Absorbances were measured spectrophotometrically (Uvikon 930 spectrophotometer, Kontron Instruments S.A., Madrid, Spain) at 595 nm. The reducing capacity of the sample was calculated by referencing the calibration curve calculated for the pattern of Fe(II) produced from known concentrations of iron II sulphate heptahydrate (Panreac Química S.A., Barcelona, Spain). The results (in triplicate) are expressed as $\mu\text{mol Fe(II)}/\text{g sample}$.

2.3.5. Thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) assay

Lipid oxidation in DEs was evaluated (in triplicate) through changes in TBARS (expressed as mg MDA/Kg of sample) as described by Serrano, Cofrades, and Jimenez-Colmenero (2006).

2.4. Antioxidant capacity and lipid oxidation in meat systems

The antioxidant capacity and lipid oxidation of MS were evaluated by DPPH free radical scavenging and TBARS as reported above.

2.5. Statistical analysis

The repeated measures test was used for statistical comparisons between samples. Data were analysed using SPSS Statistics 19.0 (IBM Corporation, Somers, NY, USA) for one-way and two-way ANOVA. Least squares differences were used for comparison of mean values among treatments and Tukey's HSD test to identify significant differences ($P < 0.05$) between formulations and storage times.

3. Results and discussion

In order to gain a clearer understanding of the suitability of the strategy assayed in the present study, the role of HXT was studied in both DEs and cooked MS.

3.1. Study of $W_1/O/W_2$ emulsions

Both DEs (DE/C and DE/HXT) contained 32 g/100 g chia oil. Thus, if used as a fat replacer in meat products, it could help to improve food fat content by reducing the proportion of fat and increasing the concentration of α -linolenic acid.

3.1.1. Physical characteristics of $W_1/O/W_2$ emulsions

Physical characteristics of DEs with and without HXT were studied during storage. Initially both DEs showed high emulsion stability with little sign of phase separation (creaming proportion over 98%, which remained above 95% throughout storage). Initial DE/C emulsion showed a monomodal distribution, ranging from 0.5 to 10–20 μm (Fig. 1a), while DE/HXT tended to be bimodal, consisting predominantly of droplets ranging from 0.5 to 20 μm with a small proportion between 20 and 100 μm (Fig. 1b). DE/C emulsion had a narrower droplet size range (Fig. 1a and b) and a smaller ($P < 0.05$) mean droplet size (Table 3) than the DE/HXT. The monomodal distribution is consistent with reports of DEs using PGPR as lipophilic emulsifier (Choi, Decker, & McClements, 2009; Cofrades et al., 2013), although bimodal (Hemar, Cheng, Oliver, Sanguansri, & Agustin, 2010; O'Regan & Mulvihill, 2009) or even trimodal (Surh, Vladislavjevic, Mun, & McClements, 2007) particle size distribution has been reported in DEs. Bimodal size distributions similar to that found for DE/HXT have been reported in DEs prepared using chia oil as lipid phase (Carrillo-Navas et al., 2012). Storing the multiple emulsions at 4 °C produced some variations in particle size distribution, consisting in an increase in the volume frequency distribution (Fig. 1a and b). Also, during storage a bimodal system was developed in DE/C, similar to the one

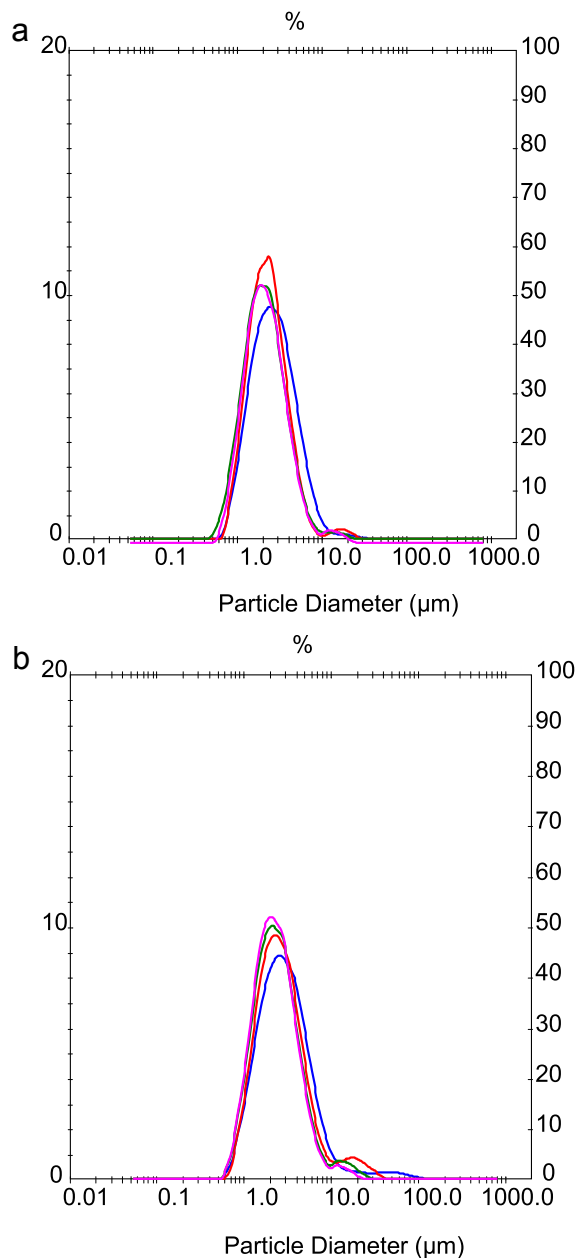


Fig. 1. (a) Influence of storage time on particle size distribution of the control double emulsion (DE/C) (without hydroxytyrosol, HXT). Day 1 (blue), day 3 (red), day 7 (green) and day 10 (pink). (b) Influence of storage time on particle size distribution of the double emulsion containing hydroxytyrosol (DE/HXT). Day 1 (blue), day 3 (red), day 7 (green) and day 10 (pink). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

described for DE/HXT, with a narrowing of the range of droplet size distribution in this relatively small second population of droplets. These results are consistent with a decrease ($P < 0.05$) of mean particle size ($D_{4,3}$) at the 3rd day of storage in DE/C and through to the 7th day in the case of DE/HXT, with no subsequent changes in either $W_1/O/W_2$ emulsion (Table 3). In any case, the changes diminished quantitatively, indicating good storage stability. There have been reports of mean particle diameters increasing or remaining unchanged in the course of storage (Carrillo-Navas et al., 2012; Choi et al., 2009; O'Reagan & Mulvihill, 2009), or even diameter diminishing (Fechner, Knoth, Scherze, & Muscholik, 2007). The small observed change in droplet size (Table 3 and

Table 3

Effect of storage on particle size ($D_{4,3}$), free radical scavenging of DPPH, ferric reducing antioxidant power assay (FRAP) and thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) of double emulsions.

	Storage days at 4 °C			
	1	3	7	10
<i>Particle size ($D_{4,3}$) μm</i>				
DE/C	3.45 ± 0.16^{a1}	2.80 ± 0.03^{b1}	2.54 ± 0.05^{b1}	2.73 ± 0.08^{b1}
DE/HXT	4.46 ± 0.37^{a2}	3.71 ± 0.07^{b2}	3.10 ± 0.01^{c2}	2.93 ± 0.09^{c1}
<i>DPPH (%)</i>				
DE/C	13.45 ± 0.05^{a1}	32.18 ± 0.03^{b1}	3.92 ± 0.03^{c1}	2.94 ± 0.03^{d1}
DE/HXT	20.32 ± 0.04^{a2}	46.76 ± 0.05^{b2}	0.86 ± 0.03^{c2}	1.17 ± 0.04^{d2}
<i>FRAP ($\mu\text{mol Fe}^{2+}$ eq/g)</i>				
DE/C	0.55 ± 0.03^{a1}	0.64 ± 0.04^{a1}	0.94 ± 0.04^{b1}	0.403 ± 0.02^{c1}
DE/HXT	1.91 ± 0.03^{a2}	1.84 ± 0.10^{ab2}	1.80 ± 0.03^{b2}	0.750 ± 0.03^{c2}
<i>TBARS (mg MDA/kg sample)</i>				
DE/C	6.70 ± 1.64^{a1}	6.06 ± 1.35^{a1}	3.48 ± 1.04^{b1}	3.24 ± 1.19^{b1}
DE/HXT	4.73 ± 1.46^{a2}	2.36 ± 0.61^{b2}	1.39 ± 0.33^{c2}	1.38 ± 0.36^{c2}

Mean \pm SD. ($n = 6$) DE/C control double emulsion; DE/HXT, double emulsion with hydroxytyrosol incorporated. Different letters in the same row or numbers in the same column indicate significant differences ($P < 0.05$).

Fig. 1a and b) could be due to swelling of water droplets, which could have ruptured and drained into the W_2 (Fechner et al., 2007). Our findings suggest that when HXT was included in the inner aqueous water phase, oil droplet size increased, affecting particle size distribution (Fig. 1a and b). Hemar et al. (2010) reported that the addition of resveratrol produced no obvious effects on the particle size distribution of multiple emulsions, while Choi et al. (2009) found an increase in the mean particle diameter $D_{3,2}$ due to the incorporation of Fe in the inner aqueous phase.

Microscopic images of DEs show the compartmented structure of the DEs, consisting of relatively large oil droplets (of different sizes) with some smaller water droplets inside (Fig. 2a and b). The oil droplets observed were generally larger in DE/HXT than in DE/C (Fig. 2a and b), which is consistent with the particle size and distribution results (Table 3, Fig. 1a and b). In both samples droplet size decreased during chilled storage (data not shown).

3.1.2. Antioxidant activity of HXT in $W_1/O/W_2$ emulsions prepared with chia oil as lipid phase

The antioxidant capacity of DEs, as determined by the DPPH assay, was affected by the level of HXT and storage time, with significant interaction between the two variables (Table 3). DE/HXT had higher DPPH inhibition values than DE/C up to the 7th day of storage (Table 3). The highest antioxidant capacity value ($P < 0.05$) in both types of DE was observed at the beginning of storage (46.76 ± 0.05 and 32.18 ± 0.03 , respectively). It is possible that this value was due to bioactive components (tocopherols, polyphenols, carotenoids, phospholipids) present in chia oil and to the addition of natural antioxidants, such as phenolic compounds (Ixtaina et al., 2011).

The FRAP level was affected by the level of HXT and storage time, with significant interaction between the two variables (Table 3). DE/HXT presented greater ($P < 0.05$) reductive capacity than DE/C, confirming that HXT protects the emulsified oil during storage (Table 3). FRAP results also showed a decrease over time and the result was consistent with the result of the DPPH assay. The loss of reducing capacity of samples over storage may be due in part to the release of antioxidants to the outer aqueous phase and their interaction with the lipid phase.

Table 3 shows TBARS values, which were affected by the level of HXT and storage time, with significant interaction between the two variables. The emulsion without HXT (DE/C) showed the highest ($P < 0.05$) oxidation level over the entire storage period, demonstrating the antioxidant effect of HXT. Cofrades et al. (2011) found

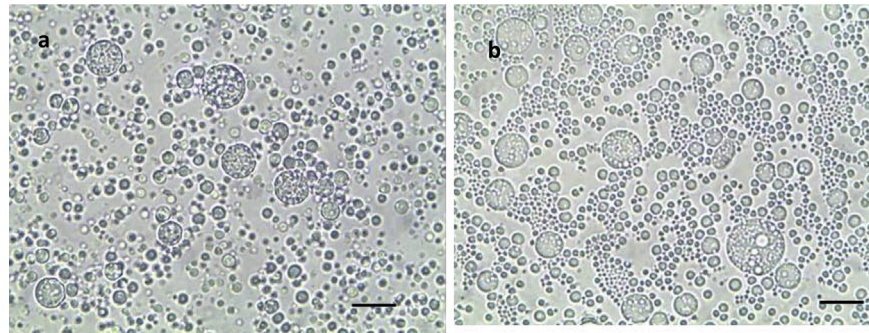


Fig. 2. Light microscopy images of double emulsion control (a) and with HXT (b) at the beginning of chilled storage (1 day after preparation at 4 °C). Scale bars represent 10 μ m.

that a 100 mg/1000 g concentration of HXT provided high protection against lipid peroxidation in O/W with olive oil. The TBARS values observed in the DEs over the course of the study (ranging from 1 to 6 mg MDA/kg sample) indicated some degree of oxidation; this was possibly due to the DE preparation process, during which the temperature of the chia oil (with high PUFA content) and the lipophilic emulsifier increased to almost 60 °C. It seems clear that the HXT was already exerting an antioxidant effect at this stage given the difference from the TBARS values at the outset of storage (Table 3). Poyato et al. (2013) also indicated that preparation of DEs could produce slight lipid oxidation. This highlights the desirability of protecting the lipid phase with DEs enriched with antioxidants. TBARS levels in DEs decreased during storage. These results are probably related to the instability of secondary oxidation products as determined by TBARS.

The inhibition of lipid oxidation capacity of HXT in the inner aqueous phase of DEs seems to be related to several phenomena. First, its location at the DE interface allows HXT to come into contact with chia oil. The physical location of antioxidants like HXT in emulsions depends on their lipid- and water-solubility. Although HXT is hydrophilic, it has the ability to inhibit lipid oxidation in O/W emulsions (Cofrades et al., 2011; Medina et al., 2009), which is generally related to its location at the droplet interphase (Medina et al., 2009). This location in the oil-water interphase will help to protect against oxidation of chia oil outside the inner aqueous phase. This mechanism has been identified as the source of antioxidant activity of other phenolic antioxidants in DEs (Poyato et al., 2013). The initial step in lipid oxidation in emulsions takes place at the oil-water interphase (McClements & Decker, 2000); in the case of DEs there are two interfacial regions (stabilized by means of hydrophilic and lipophilic surfactants): W_1 -O and O- W_2 . It has been suggested that in DEs the lipid phase is protected by the outer aqueous phase. In our experiment the difference in physical properties of DEs was too small to be considered relevant. Therefore, there was a direct antioxidant effect on the W_1 /O interface, which

would not have occurred without interaction between antioxidant and oxidizable substrate (promoting increased TBARS), although the system could express its antioxidant capacity (DPPH and FRAP). There is another element of oxidative processes that is associated with the slow release of HXT into the lipid phase, so that there is a reservoir of antioxidants capable of inhibiting lipid oxidation during processing and storage through various mechanisms (Dwyer, Beirne, Eidhin, & Kennedy, 2012; Garti, 1997).

It is also important to consider the potential role of emulsifiers (lipophilic and hydrophilic), which are able to interact with many components of the system and therefore to affect lipid oxidation. The caseinate used as hydrophilic emulsifier, which is present at the interface between the chia oil and the outer aqueous phase, has proven to be highly effective against lipid oxidation. These antioxidant properties have been attributed to its ability to scavenge lipid oxidation products in the lipid phase and to chelate transition metals (Dwyer et al., 2012; Matalanis, Decker, & McClements, 2012).

Lipid oxidation in the chia oil emulsions stored for 10 days shows that the HXT effectively protected against oxidation. However, behaviour versus time depends on the mechanism whereby the oxidative status is determined, which differs appreciably among the three methods employed.

Under the conditions applied in this experiment (up to 10 days at 4 °C), DEs showed good stability, usually for longer than is required for this food application (Cofrades et al., 2013). However, it would be desirable from the standpoint of oxidative stability to use these ingredients before day 3 of storage.

3.2. Meat systems

Lipid oxidation is a major problem in meat processing. It is favoured by the fact that meat products are complex systems composed of different phases and constituents, e.g. air, water, lipid and solid particles. PUFA-enrichment, loss of structural integrity, heat processing, NaCl, storage, etc. all enhance the rate and extent

Table 4
Percent of inhibition of DPPH in meat batters over storage.

	Storage days at 4 °C				
	1	7	19	28	39
MB/C	16.88 \pm 0.05 ^{a1}	4.25 \pm 0.06 ^{b1}	1.53 \pm 0.02 ^{c1}	1.98 \pm 0.03 ^{d1}	1.86 \pm 0.04 ^{e1}
MB/LO	24.22 \pm 0.10 ^{a2}	12.31 \pm 0.13 ^{b2}	2.61 \pm 0.04 ^{c2}	2.72 \pm 0.09 ^{c2}	1.42 \pm 0.04 ^{d2}
MB/LO/HXT	39.19 \pm 0.05 ^{a3}	22.58 \pm 0.37 ^{b3}	3.11 \pm 0.11 ^{c3}	2.18 \pm 0.03 ^{c3}	0.94 \pm 0.03 ^{d3}
MB/DE/C	17.7 \pm 0.04 ^{a4}	13.36 \pm 0.17 ^{b4}	1.41 \pm 0.03 ^{c4}	4.62 \pm 0.04 ^{d4}	3.04 \pm 0.99 ^{e4}
MB/DE/HXT	31.14 \pm 0.06 ^{a5}	29.69 \pm 0.06 ^{b5}	2.84 \pm 0.02 ^{c5}	3.24 \pm 0.07 ^{d5}	1.29 \pm 0.02 ^{e5}

Mean \pm SD. (n = 6) MB/C meat batter (control) made with pork fat; MB/LO sample formulated by replacing pork backfat with liquid chia oil; MB/LO/HXT sample similar to MB/LO but including HXT (100 mg/1000 g) dissolved in the added water; MB/DE/C sample formulated replacing pork backfat with the double emulsions DE/C (Table 1); MB/DE/HXT sample formulated replacing pork backfat with the double emulsions with HXT encapsulated (DE/HXT). Different letters in the same row or numbers in the same column indicate significant differences ($P < 0.05$).

Table 5
Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS, mg MDA/kg sample) in meat batters over storage.

	Storage days at 4 °C				
	1	7	19	28	39
MB/C	2.79 ± 0.09 ^{a1}	1.48 ± 0.01 ^{b1}	2.11 ± 0.05 ^{bc1}	2.46 ± 0.40 ^{ac1}	2.91 ± 0.03 ^{ac1}
MB/LO	8.61 ± 0.66 ^{ab2}	8.19 ± 0.53 ^{a2}	7.89 ± 0.22 ^{a2}	8.35 ± 0.36 ^{ab2}	8.94 ± 0.04 ^{b2}
MB/LO/HXT	3.53 ± 0.27 ^{a3}	2.73 ± 0.37 ^{b3}	2.55 ± 0.03 ^{b1}	2.51 ± 0.39 ^{b1}	2.84 ± 0.03 ^{b1}
MB/DE/C	13.1 ± 0.35 ^{a4}	11.1 ± 0.45 ^{b4}	14.0 ± 0.22 ^{c3}	11.9 ± 0.41 ^{d3}	13.5 ± 0.37 ^{ac3}
MB/DE/HXT	4.29 ± 0.07 ^{a5}	3.22 ± 0.14 ^{b3}	3.56 ± 0.07 ^{b4}	3.19 ± 0.12 ^{b4}	3.39 ± 0.04 ^{b1}

Mean ± SD. (n = 6) MB/C meat batter (control) made with pork fat; MB/LO sample formulated by replacing pork backfat with liquid chia oil; MB/LO/HXT sample similar to MB/LO but including HXT (100 mg/1000 g) dissolved in the added water; MB/DE/C sample formulated replacing pork backfat with the double emulsions DE/C (Table 1); MB/DE/HXT sample formulated replacing pork backfat with the double emulsions with HXT encapsulated (DE/HXT). Different letters in the same row or numbers in the same column indicate significant differences ($P < 0.05$).

of lipid oxidation of MS. On the other hand endogenous antioxidants (carnosine, anserine, antioxidant enzymes) may also play important roles in oxidative stability of meat (Min, Nam, Cordray, & Ahn, 2008). Depending on the above compositional/processing factors, the prooxidant-antioxidant balance may substantially affect oxidative stability. The MS formulated in this experiment contained relatively high concentrations of fat (over 11 g/100 g) with high levels of unsaturated fatty acids (over 5 g of PUFA/100 g of product); additionally they presented considerable structural disintegration, which favoured the exposure and accessibility of labile compounds to oxygen; and finally the specific heating conditions used in this experiment, i.e. a relatively low temperature (70 °C) for a short period of time, would render them prone to lipid oxidation (Cofrades et al., 2011). On the other hand, lipid oxidation in heterophasic systems such as emulsions is generally recognized as being very complex as it may include oxidation in all the different phases of the systems, making the mechanisms of lipid oxidation in emulsions very different and significantly more complex than lipid oxidation in bulk oil systems (Jacobsen, Let, Nielsen, & Meyer, 2008).

Fresh DEs were used for preparation of meat batters, which thus had antioxidant properties from the outset, with no limitations due to storage of these ingredients (Table 3).

3.2.1. Antioxidant activity of hydroxytyrosol in meat systems

DPPH scavenging activity of samples was affected by meat batter formulation and storage time (Table 4), with significant interaction between the two variables. Initially, there were significant differences among all samples. DPPH scavenging activity was higher in modified samples than in MB/C and the highest inhibitory activity (around 40%) was registered in the meat batter with liquid chia oil and HXT (MB/LO/HXT), followed by the sample made with the DEs with chia oil as lipid phase and HXT (MB/DE/HXT). In meat batters formulated with DEs (MB/DE and MB/DE/HXT), DPPH scavenging activity was 7–8% lower than in the systems made with liquid chia oil (MB/LO and MB/LO/HXT). The relative amounts of radical scavenging compounds at the beginning of storage may be attributed to a number of factors. It has been reported that compounds able to scavenge DPPH radicals in pork meat seemed to be heat-stable (Min et al., 2008). In any case, given that all samples received the same thermal treatment, DPPH scavenging activity may have been more influenced by factors associated with the presence of the non-meat ingredients; at 7 days of storage the DPPH scavenging activity had decreased ($P < 0.05$) in all samples. Values were lowest in MB/C, higher in the meat batters with HXT and highest ($P < 0.05$) in the sample with encapsulated HXT (Table 4). After 7 days of storage there was a considerable decrease of inhibitory activity, with levels below 5% at 19 days and between 1 and 3% at the end of storage. Although there were significant variations among samples, these were generally small (Table 4).

Endogenous antioxidants may be active against DPPH and play an important role in the protective effect against free radicals (Min et al. 2008). Like Min et al. (2008), the present authors observed a decrease of DPPH scavenging activity in pork meat during chilled storage.

3.2.2. Lipid oxidation (TBARS)

Lipid oxidation values were affected by formulation and storage time (Table 5), with significant interaction between the two variables. In relation to the formulation and processing conditions, the differences found initially in oxidation levels can be attributed mainly to the effect induced by the heat treatment, which is dependent on the formulation (Table 2). All samples containing chia oil had higher TBARS values than all pork fat samples (MB/C). The samples with DEs (MB/DE) had higher ($P < 0.05$) TBARS than the ones made with liquid chia oil (MB/LO). This may be the result of greater interaction between the meat component and the oxidizable substrate forming the interface that surrounds the chia oil in MB/LO. The high lipid oxidation of samples prepared with DEs (MB/DE/C and MB/DE/HXT) is consistent with the relatively low DPPH scavenging activity (Table 4) found in this sample initially. The oxidative stability of the meat batters was increased by addition of HXT, whether added directly (MB/LO/HXT) or included in the DEs (MB/DE/HXT), as compared to the PUFA-enriched meat batters without antioxidant (MB/LO and MB/DE respectively). In both types of samples, the presence of HXT reduced ($P < 0.05$) the lipid oxidation by more than 50%. Although there were significant variations in TBARS values, initial levels of oxidation remained apparently constant throughout storage (Table 5). Similar results have been reported by Jo, Son, Son and Byun (2003). The capacity of HXT to inhibit lipid oxidation has been demonstrated in foodstuffs rich in fish lipids (Medina et al., 2009; Pazos, Alonso, Sanchez, & Medina, 2008) and in pre-cooked beef and pork meat (DeJong & Lanari, 2009). Its efficiency in inhibiting lipid oxidation varied thus: cooked meat batter > oil-in-water emulsion > frankfurters.

Although the antioxidant effect of HXT was particularly pronounced throughout the experiment, it was greater when HXT was added directly to the matrix than when it was added as part of a DE. This relatively higher antioxidant activity could indicate a smaller presence in the meat product and hence less availability when ingested, limiting its direct potential effects on the body.

4. Conclusions

Multiple emulsions provide new ways to incorporate functional ingredients in foods. The W₁/O/W₂ emulsions prepared with chia oil had good stability and a homogeneous structure. W₁/O/W₂ emulsions containing HXT showed good antioxidant capacity in the early days of storage. Among other effects, factors associated with the complexity of the matrix or the nature of the compounds

evaluated limited the possibilities of establishing clear relationships among parameters of lipid oxidation (levels reached) and antioxidant capacity (protective capacity against oxidation) of the matrix.

Oxidative stability of each of the different MS studied can be interpreted in terms of several factors associated with the composition and processing conditions. The presence of chia oil, with the attendant increase in the level of unsaturation of the lipids, promotes lipid oxidation in cooked meat batters, but it also appears to supply some compounds that can help to protect against oxidation (DPPH scavenging activity). However, chia oil is more susceptible to oxidation when it is incorporated in the DE than when added in liquid form, possibly due to the degree of interaction with meat proteins. HXT demonstrated antioxidant capacity, although the level of efficiency depended on the way in which it was incorporated in the matrix. HXT appeared to exert less antioxidant capacity when included in the inner aqueous phase of the DE than when solubilized in water and added to the MS directly.

Acknowledgements

This research was supported by the projects AGL2011-29644-C02-01 and 02. Thanks are due to the foreign PhD studies fellowship awarded to J. A. Santos-López from CONACYT, Mexico.

References

- Ayerza, R., & Coates, W. (2005). Ground chia seed and chia oil effects on plasma lipids and fatty acids in the rat. *Nutrition Research*, 25, 995–1003.
- Bastida, S., Sánchez-Muniz, F., Olivero, R., Pérez-Olleros, L., Ruiz-Roso, B., & Jiménez-Colmenero, F. (2009). Antioxidant activity of carob fruit extracts in cooked pork meat systems during chilled and frozen storage. *Food Chemistry*, 116, 748–754.
- Carrillo-Navas, H., Cruz-Olivares, J., Varela-Guerrero, V., Alamilla-Beltrán, L., Vernon-Carter, E. J., & Pérez-Alonso, C. (2012). Rheological properties of a double emulsion nutraceutical system incorporating chia essential oil and ascorbic acid stabilized by carbohydrate polymer–protein blends. *Carbohydrate Polymers*, 87, 1231–1235.
- Choi, S. J., Decker, E. A., & McClements, J. (2009). Impact of iron encapsulation within the interior aqueous phase of water-in-oil-in-water emulsions on lipid oxidation. *Food Chemistry*, 116, 271–276.
- Cofrades, S., Salcedo, L., Delgado-Pando, G., López-López, I., Ruiz-Capillas, C., & Jiménez-Colmenero, F. (2011). Antioxidant activity of hydroxytyrosol in frankfurters enriched with n-3 polyunsaturated fatty acids. *Food Chemistry*, 129, 429–436.
- Cofrades, S., Antoniou, I., Solas, M. T., Herrero, A. M., & Jiménez-Colmenero, F. (2013). Preparation and impact of multiple (water-in-oil-in-water) emulsions in meat systems. *Food Chemistry*, 141, 338–346.
- DeJong, S., & Lanari, M. C. (2009). Extracts of olive polyphenols improve lipid stability in cooked beef and pork: contribution of individual phenolics to the antioxidant activity of the extract. *Food Chemistry*, 116, 892–897.
- Dwyer, S. P. O., Beirne, D. O., Eidhin, D. N., & Kennedy, B. T. O. (2012). Effects of Green Tea Extract and alpha-tocopherol on the lipid oxidation rate of omega-3 oils, incorporated into table spreads, prepared using multiple emulsion technology. *Journal of Food Science*, 77, N58–N65.
- Fechner, A., Knoth, A., Scherze, I., & Muschiolik, G. (2007). Stability and release properties of double-emulsions stabilised by caseinate-dextran conjugates. *Food Hydrocolloids*, 21, 943–952.
- Garti, N. (1997). Progress in stabilization and transport phenomena of double emulsions in food applications. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie*, 30, 222–235.
- Hemar, Y., Cheng, L. J., Oliver, C. M., Sanguansri, L., & Agustin, M. (2010). Encapsulation of resveratrol using water-in-oil-in-water double emulsions. *Food Biophysics*, 5, 120–127.
- Ixtaina, V., Martínez, M., Spotorno, V., Mateo, C. M., Maestri, D., Diehl, B., et al. (2011). Characterization of chia seed oils obtained by pressing and solvent extraction. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24, 166–167.
- Jacobsen, C., Let, M. B., Nielsen, N. S., & Meyer, A. S. (2008). Antioxidant strategies for preventing oxidative flavour deterioration of foods enriched with n-3 polyunsaturated lipids: a comparative evaluation. *Trends in Food Science & Technology*, 19, 76–93.
- Jiménez-Colmenero, F. (2007). Healthier lipid formulation approaches in meat based functional foods. Technological options for replacement of meat fats by non-meat fats. *Trends in Food Science & Technology*, 18, 567–578.
- Jiménez-Colmenero, F. (2013). Potential applications of multiple emulsions in the development of healthy and functional foods. *Food Research International*, 52, 64–74.
- Jo, C., Son, J. H., Son, C. B., & Byun, M. W. (2003). Functional properties of raw and cooked pork patties with added irradiated, freeze-dried green tea leaf extract powder during storage at 4 °C. *Meat Science*, 64, 13–17.
- Matalanis, A., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2012). Inhibition of lipid oxidation by encapsulation of emulsion droplets within hydrogel microspheres. *Food Chemistry*, 132, 766–772.
- McClements, D. J., & Decker, E. A. (2000). Lipid oxidation in oil-in-water emulsions: impact of molecular environment on chemical reactions in heterogeneous food systems. *Journal of Food Science*, 65, 1270–1282.
- Medina, I., Lois, S., Alcantara, D., Lucas, R., & Morales, J. C. (2009). Effect of lipophilization of hydroxytyrosol on its antioxidant activity in fish oils and fish oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 9773–9779.
- Min, B., Nam, K. C., Cordray, J., & Ahn, D. U. (2008). Endogenous factors affecting oxidative stability of beef loin, pork loin, and chicken breast and thigh meats. *Journal of Food Science*, 73, C439–C446.
- O'Regan, J., & Mulvihill, D. M. (2009). Water soluble inner aqueous phase markers as indicators of encapsulation properties of water-in-oil-in-water emulsions stabilized with sodium caseinate. *Food Hydrocolloids*, 23, 2339–2345.
- Pazos, M., Alonso, A., Sanchez, I., & Medina, I. (2008). Hydroxytyrosol prevents oxidative deterioration in foodstuffs rich in fish lipids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 3334–3340.
- Poyato, C., Navarro-Blasco, I., Calvo, M. I., Caverio, R. Y., Astiasaran, I., & Ansorena, D. (2013). Oxidative stability of O/W and W/O/W emulsions: effect of lipid composition and antioxidant polarity. *Food Research International*, 51, 132–140.
- Sánchez-Muniz, F. J., Olivero-David, R., Triki, M., Salcedo, L., González-Muñoz, M. J., Cofrades, S., et al. (2012). Antioxidant activity of *Hypericum perforatum* L. extract in enriched n-3 PUFA pork meat systems during chilled storage. *Food Research International*, 48, 909–915.
- Serrano, A., Cofrades, S., & Jimenez-Colmenero, F. (2006). Characteristics of restructured beef steak with different proportions of walnut during frozen storage. *Meat Science*, 72, 108–115.
- Surh, J., Vladisavljevic, G. T., Mun, S., & McClements, D. J. (2007). Influence of pH, emulsifier concentration and homogenization condition on the production of stable oil-in-water emulsion droplets coated with fish gelatin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 175–184.

APARTADO 4.1.2.

ARTÍCULO 2

Olive oil based edible W/O/W emulsions
stability as affected by addition of some
acylglycerides

Fernández-Martin, F., Freire, M., Bou, R., Cofrades, S. and Jiménez-Colmenero, F. (2017).
LWT - Food Science and Technology **59**(2): 941-947



Olive oil based edible W/O/W emulsions stability as affected by addition of some acylglycerides



Fernando Fernández-Martín^{*}, María Freire, Ricard Bou¹, Susana Cofrades, Francisco Jiménez-Colmenero

Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN-CSIC), Ciudad Universitaria, 28040 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 June 2016

Received in revised form

18 September 2016

Accepted 9 October 2016

Available online 19 October 2016

Keywords:

Double emulsions

Fat-crystallizers

Mono- and di-acyl glycerides

Liquid crystals

Pickering effect

Physical properties

ABSTRACT

Olive oil based W/O/W double emulsions (DEs) were prepared with polyglycerol polyricinoleate (PGPR, 3 or 6%) and sodium caseinate as emulsifiers both singly in a control sample, and with the addition of two fat-crystallizers (Verols V10 or V50) at two concentrations (3 or 6%). Globule size distribution was essentially monomodal with area-volume mean diameter (d_{32}) values $\sim 2 \mu\text{m}$. Creaming along an 8 d refrigerated storage was always minor. The predominant elastic behavior in control samples evolved to viscous in samples with Verols. DSC revealed that V10 and V50 crystallized as α - and β' -polymorphs respectively, that can absorb at a W/O interface, potentially producing interfacial crystallization ($V10 < V50$). Instead, ($V10 > V50$) concerning DEs stabilization because V50 plus 3 or 6% PGPR produced essentially glassy matrices, thus impeding Pickering effects. V10 plus 3 or 6% PGPR formed crystalline DEs with presence of lyotropic mesophases, which yielded W/O Pickering stabilization effects.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

A water-in-oil-in-water (W/O/W) emulsion is a multi-compartmentalized system consisting of water droplets dispersed in oil droplets which in turn are dispersed in a continuous aqueous phase. Double emulsions (DEs) of this kind offer some advantages for food applications as ingredients in low-calorie and reduced-fat products, masking flavors, preventing lipid oxidation, improving sensory characteristics of foods, controlling the release of bioactive compounds and protecting labile ingredients during storage or digestion (McClements et al., 2007; Muschiolik, 2007). DEs also offer the possibility of encapsulating nutritional and bioactive compounds and thus constitute a promising technological approach to optimization of dietary active component supplies in new food systems such as functional foods (Jiménez-Colmenero, 2013).

One main aspect to be considered in designing DEs for food use is the nature and concentration of the components used in their formulation. Composition and emulsification conditions are of

crucial importance to achieve the required final characteristics of these systems and hence the desired quality of the food. Other important aspects are mechanical stability, encapsulation efficiency if required, and appropriateness of texture for a given application. In this regard, various strategies have been used to convert easily-flowing fluids into more viscous dispersions or solid-like structures. In fact, a variety of compounds have been used to modify texture and/or achieve gelation of the internal (Dickinson, 2011; McClements et al., 2007) and external water phases. Various different fat types (e. g. vegetable fats with different solid fat contents, saturated monoglycerides, mono- and di-glycerides mixes) have also been proposed for this purpose (Frasch-Melnik et al., 2010; Macierzanka et al., 2009; Weiss and Muschiolik, 2007).

One particular concern is the type and concentration of the surfactants responsible for the interfacial properties of primary and multiple emulsions. PGPR is the most used lipophilic emulsifier in DE preparation because of its long-term stabilizing capacity and encapsulation efficiency (Muschiolik, 2007). Its combination with sodium caseinate as hydrophilic emulsifier has been reported (Su et al., 2006) as very effective in stabilizing DEs. Some other lipophilic emulsifiers such as lecithins and mono- and di-glycerides of fatty acids, the latter type induce fat crystallization, have also been used in many food applications. These surface-active fat crystals can stabilize emulsions by creating a mechanical barrier against oil-

^{*} Corresponding author.

E-mail address: fermarfer@ictan.csic.es (F. Fernández-Martín).

¹ Present address: Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA), Finca Camps i Armet, 17121 Monells, Girona, Spain.

drop coalescence, i.e., by Pickering effect (Garti et al., 1999; Rousseau, 2000). However, it is known that fat crystals in the dispersed phase of oil-in-water (O/W) emulsions may be detrimental to system stability when they protrude from oil droplets, causing coalescence (Frasch-Melnik et al., 2010). Addition of mono- and di-glycerides mixes may also convert fluid oils into fat-like lipids that withstand relatively high temperatures before melting, and may also increase viscosity (different textural properties), opening up new possibilities for several food applications, like animal fat replacement by low-caloric and healthier formulations.

The aim of this paper was to investigate olive oil based food-grade $W_1/O/W_2$ emulsions (DEs), where PGPR as lipophilic emulsifier in the oily phase was used to stabilize the primary (W_1/O) emulsion, and sodium caseinate as hydrophilic emulsifier in the outer W_2 phase. Two commercial mono- and di-acylglycerides mixes (MDAG) at two concentration levels (3 or 6%) were used to induce fat-crystallization in the oily phase, thus helping to stabilize the lipid-phase. The impact of these design parameters on ten produced DEs was compared with control samples with no MDAG added. Lipid-globule morphology and size-distribution, thermal behavior, physical stability (creaming), viscometry and dynamic rheology were studied on the obtained DEs for their use as ingredients in food processing.

DSC is considered a powerful tool to track the solidification-melting process in the eleven lipid phases formulated, and to see how they affect the overall thermal behavior of the corresponding derivative DEs.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Olive oil was from Carbonell SOS (Cuétara S.A.; Madrid, Spain). PGPR (synthetic emulsifier with a complex composition of polyglycerol esters of inter-esterified ricinoleic acid) was from Lasenor Emul S.L. (Olesa de Montserrat, Spain) as additive E-476. Mono- and di-glyceride mixtures (MDAG) with a hydrogenated vegetable oil: Verol CRS-10 and Verol CRS-50 (V10 and V50 in the abstract) containing at least 10% and 45% mono-glycerides respectively (supplier information) were also from Lasenor Emul S.L. as additive E-471. Sodium caseinate (Excellion EM 7) was from DMV Campina B.V (Veghel, the Netherlands). Sodium chloride and trichloroacetic acid ACS grade were from Panreac Quimica, S.A. (Barcelona, Spain). Riboflavin, sodium azide, and tetrahydrofuran HPLC grade were from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain).

2.2. Double emulsion (DE) preparations

The inner phase (W_1) consisted of 0.1 M NaCl aqueous solution. The outer phase (W_2) was prepared by dissolving 0.1 M NaCl, 0.5% sodium caseinate (w/v) hydrophilic emulsifier, and 0.02% sodium azide (preservative against mold growth). The pH of both aqueous phases was in the range 5.93–6.84. Lipid phases (O) were formed by olive oil with 3 or 6% PGPR, and then mixed with 2 levels (3 or 6%) of V10 or V50. These Vs concentrations were selected on the basis of the rheological behavior of the new lipid phases as assessed by previous viscosity trials at 4 °C. The components of these complex lipid phases were mixed for 15 min at 70 °C in a TM-31 food processor (Thermomix, Vorked, Germany) at setting 3 (500 rpm).

The $W_1/O/W_2$ emulsions (DEs) were prepared following a two-step procedure as reported elsewhere (Cofrades et al., 2013) with minor modifications. The primary emulsions (W_1/O) were produced by dripping the inner aqueous phase (W_1 ; 20%) into the corresponding lipid phase (O; 80%) in the Thermomix food processor set at 60 °C, 15 min, 3250 rpm. The resulting coarse emulsion

was passed twice through a two-stage high pressure homogenizer at 550/70 bar (first/second stage) (Panda Plus 1000, GEA NiroSoavi, Parma, Italy) to obtain a primary fine emulsion (W_1/O). 40% of this fine emulsion was then gradually added to the outer aqueous phase (W_2 ; 60%) in the Thermomix processor set at 50 °C and 700 rpm. This coarse emulsion was also passed twice through the high pressure homogenizer at 150/30–40 bar to finally obtain the fine $W_1/O/W_2$ double emulsion (DE), which was stored at 4 °C for 24 h before measurements. The storage temperature (4 °C) was the same in all cases and the selected storage time (8 d) was much longer than would be required for any intended food application, such as in meat products formulation. Table 1 summarized the composition of the DEs prepared.

2.3. Microscopy

Emulsion morphology was examined by optical microscopy. Samples were placed on microscope slides and carefully covered with cover slips. The microstructure of DEs was observed with an optical microscope (Reichert, Munich, Germany) at 40× and 100× magnifications. Measurements were made at the initial and final storage time, i.e., 1 and 8 d.

2.4. Particle size determination

Before measurement, DEs samples were diluted between 1/8 and 1/10 with a salt solution of the same molarity as the inner aqueous phase (0.1 M NaCl) to perform measurements (equipment obscuration ranging from 8 to 15%). The particle size distributions of the DEs oil globules were then determined over the storage period with a Malvern Mastersizer S laser diffraction particle size analyser (Malvern Instrument Ltd, Worcestershire, UK) equipped with a He-Ne laser ($\lambda = 633$ nm). The measurement range was 0.05 – 900 μm . Particle size calculations were performed by the Mastersizer S software. The area-volume mean diameter (d_{32}) were measured at 1, 3, 6, 8 days of storage time and reported as average values (μm) of at least three measurements.

2.5. Emulsion stability

20 mL aliquots of each DE were gently dropped into flat-bottomed glass tubes (144.5 mm height, 14.2 mm inner diam.) to determine their gravitational phase separation (creaming, %) which was visually observed in quiescent conditions. The initial height of the emulsion (H_E) and the height of the serum layer (H_S) were measured at 1, 3, 6 and 8 d of storage, as follows,

$$\text{Creaming} = ((H_E - H_S)/H_E) \times 100$$

Emulsion stability (%) was then calculated by the difference (100 – Creaming), and expressed as average of at least three determinations.

2.6. Differential scanning calorimetry (DSC)

DSC analysis was performed with a previously calibrated model TA-Q1000 differential scanning calorimeter (TA Instruments, New Castle, DE, USA). Samples of approximately 5 mg (± 0.002 mg) were weighed out using a Model ME235S electronic balance (Sartorius, Goettingen, Germany), tightly encapsulated in aluminum pans and scanned under dry nitrogen (50 mL/min) purge. An empty capsule was used as reference. Samples were heated from 0 to 60 °C at 10 °C/min and then cooled down to 0 °C before starting a second scan up to 60 °C at the same scan rates of 10 °C/min, except for V10 and V50 where the upper temperature was raised to 80 °C to cover

Table 1
Formulation of W₁/O/W₂ (DEs) emulsions.

DEs	W ₁ /O (40%)	W ₂ (60%)	
	Inner water phase (W ₁ ; 20%)	Lipid phase (O; 80%)	Outer water phase (W ₂)
DE1	0.02% SA in 0.1 M NaCl	97% O + 3% PGPR	0.5% SC + 0.02% SA in 0.1 M NaCl
DE2	0.02% SA in 0.1 M NaCl	94% O + 6% PGPR	0.5% SC + 0.02% SA in 0.1 M NaCl
DE3	0.02% SA in 0.1 M NaCl	94% O + 3% PGPR + 3% V10	0.5% SC + 0.02% SA in 0.1 M NaCl
DE4	0.02% SA in 0.1 M NaCl	91% O + 3% PGPR + 6% V10	0.5% SC + 0.02% SA in 0.1 M NaCl
DE5	0.02% SA in 0.1 M NaCl	94% O + 3% PGPR + 3% V50	0.5% SC + 0.02% SA in 0.1 M NaCl
DE6	0.02% SA in 0.1 M NaCl	91% O + 3% PGPR + 6% V50	0.5% SC + 0.02% SA in 0.1 M NaCl
DE7	0.02% SA in 0.1 M NaCl	91% O + 6% PGPR + 3% V10	0.5% SC + 0.02% SA in 0.1 M NaCl
DE8	0.02% SA in 0.1 M NaCl	88% O + 6% PGPR + 6% V10	0.5% SC + 0.02% SA in 0.1 M NaCl
DE9	0.02% SA + 0.1 M NaCl	91% O + 6% PGPR + 3% V50	0.5% SC + 0.02% SA in 0.1 M NaCl
DE10	0.02% SA in 0.1 M NaCl	88% O + 6% PGPR + 6% V50	0.5% SC + 0.02% SA in 0.1 M NaCl

O, Olive oil; PGPR, Polyglycerol Ester of Polyrinicoleic Acid. MDAG: V10; V50. SC, Sodium Caseinate. SA, Sodium Azide.

all the transition intervals. Peak temperatures (T_{peak} , °C), and transition enthalpies (ΔH , J/g_{lipids}) by linear baseline integration, were calculated. Energetic parameters were normalized to lipid-phase content according to respective formulations. Samples were analyzed in triplicate.

2.7. Viscosity

Viscometry of the different lipid phases used to produce DEs and of the resulting DEs was performed at 25 °C. Measurements (Pa·s) by quintuplicate were done in a cone-plate cell CP1/60 (1° angle and 60 mm diam.) with a 30 mm gap on a Bohlin CVO-100 rheometer (Bohlin Instruments Ltd., Gloucestershire, UK) at a constant shear stress of 10 s⁻¹.

2.8. Dynamic rheological properties

Dynamic rheological experiments were conducted on DEs using a controlled-stress Bohlin CVO-100 rheometer (Bohlin Instruments Ltd., Gloucestershire, UK), with the same measurement system as in 2.7. Temperature was controlled with a Peltier Plate system (Bohlin Instruments, Gloucestershire, UK). Samples were allowed to relax for 5 min equilibration time before performing rheological measurements. The linear viscoelastic region (LVE) was determined for each sample through stress sweeps at 0.1 Hz. After that, a dynamic frequency sweep was conducted at 25 °C applying a constant pre-determined stress within the LVE region, over a frequency range between 0.05 and 1 Hz for each sample. Elastic modulus (G' , Pa), viscous modulus (G'' , Pa) and phase angle (δ , °) were derived using the Bohlin analysis program software. Rheological results were expressed as average values of at least three measurements.

2.9. Statistical analysis

The effects of the different types of Verol (V10 and V50) and concentrations (3 and 6%) used in the preparation of the DEs, and the effect of the storage time on their particle size and physical stability were analyzed using a multifactor (two-way) ANOVA (IBM SPSS Statistics 21 software). Interactions between these two factors were also considered. A one-way ANOVA was used to examine the effect of the different treatment on the viscosity of the lipid phases and the corresponding DEs. Tukey-HSD tests were used to identify statistically significant differences. Significance level was $P \leq 0.05$.

3. Results and discussion

Ten lipid phases were initially formulated (O1 = Olive oil plus 3% PGPR; O2 = Olive oil plus 6% PGPR; O3 = O1 plus 3% V10; O4 = O1 plus 6% V10; O5 = O1 plus 3% V50; O6 = O1 plus 6% V50; O7 = O2

plus 3% V10; O8 = O2 plus 6% V10; O9 = O2 plus 3% V50; O10 = O2 plus 6% V50). Exploratory experiments indicated that their rheological and thermal behaviors produced a wide range of experimental results but that they can be summarized as ranging between samples O3 and O5, or O8 and O10 whether PGPR, V10 or V50 were formulated at 3 or 6% respectively. Consequently, DEs formulations were restricted to corresponding boundary DE3 and DE5, or DE8 and DE10, respectively. Table 1 summarized the composition of the different formulations.

Size-Exclusion High-Performance Liquid Chromatography (SEC-HPLC) was performed to check and confirm that composition of V10 and V50 complied respectively supplier specifications. Briefly, the samples (10–15 mg/mL) were applied in a high-performance liquid chromatograph (HPLC) (Agilent 1100 series, Madrid, Spain) with a 20 μ L sample loop. A refractive index detector (Agilent Technologies 1260 infinity, Madrid, Spain) and two in series connected 300 mm \times 7.5 mm i.d. (5 μ m particle size), 0.01 and 0.05 μ m, PL gel columns (Agilent, Bellefonte, PA, USA), connected in series, were operated at 40 °C. HPLC grade tetrahydrofuran was used as the mobile phase with a flow of 1 mL/min. Triacylglycerides (TAG), diacylglycerides (DAG), and monoacylglycerides (MAG) were quantified as shown in Table 2.

3.1. Morphology

Microscopic imaging (Fig. 1) at room temperature shows the characteristic compartmentalized structure of the double emulsion DE3, which was representative of all formulations (Verol samples produced no perceptible effects on DEs morphology). This structure consisted of differently-sized oil globules with some smaller water droplets inside (Fig. 1, inset), dispersed in the continuous water phase, consistent with the particle size distribution discussed below.

3.2. Particle size determination

The average lipid globule diameters (d_{32} , μ m) as affected by formulation and storage are shown in Table 3 for boundary DEs selection: DE1 and its boundary DE3 and DE5 samples, plus DE2

Table 2
Mean values \pm standard deviations of TAG, DAG, and MAG composition values (%) of V10 and V50.

Verol	Acyl Glyceride		
	TAG	DAG	MAG
V10	77.94 \pm 0.17	2.49 \pm 0.33	19.57 \pm 0.48
V50	41.90 \pm 0.95	1.67 \pm 1.07	56.43 \pm 0.94

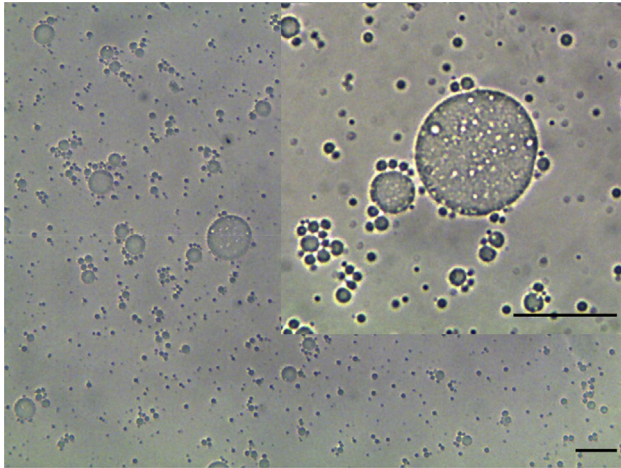


Fig. 1. Light microscopy images of DE3 after 1 d of storage at 4 °C. Bars represent 10 μm at 40× or 4 μm at 100× magnifications.

and respective DE8 and DE10. Particle sizes ranged between 1.77 and 2.23 μm, similar to those reported elsewhere in similar DEs with lipid phases consisting of differently unsaturated vegetable oils (Bou et al., 2014). These sizes were smaller than those reported in other works dealing with oily phases consisting in different amounts of PGPR (1–8%) plus lipids characterized by a high content in saturated fatty acids (d_{32} ranging from 2.9 to 9.7 μm) (Weiss and Muschiolik, 2007), or 1% PGPR, 2.5% tripalmitin and 1% saturated monoglycerides (d_{32} ranging from 23.0 to 31.5) (Frasch-Melnik et al., 2010). However, these differences may be attributed to the different emulsification conditions (pressure applied, number of passes, etc.).

Initially, all DEs exhibited monomodal distribution, similar to those found by other authors where PGPR and sodium caseinate were also used as lipophilic and hydrophilic emulsifiers respectively (Cofrades et al., 2013; Frasch-Melnik et al., 2010). The droplet distribution of control samples (DE1 and DE2) was narrower than the other DEs thus suggesting that the highly effective balance between hydrophilic and lipophilic emulsifiers were counteracted in part by the addition of Verols (Fig. 2). Between them, DE1 (3% PGPR) showed smaller d_{32} than DE2 (6% PGPR) and did not vary significantly over the storage time; to this respect 3% > 6%.

Effect of Verol additions on d_{32} depended on the type (V10 or V50), its concentration (3 or 6%) and PGPR percent used. It is worth

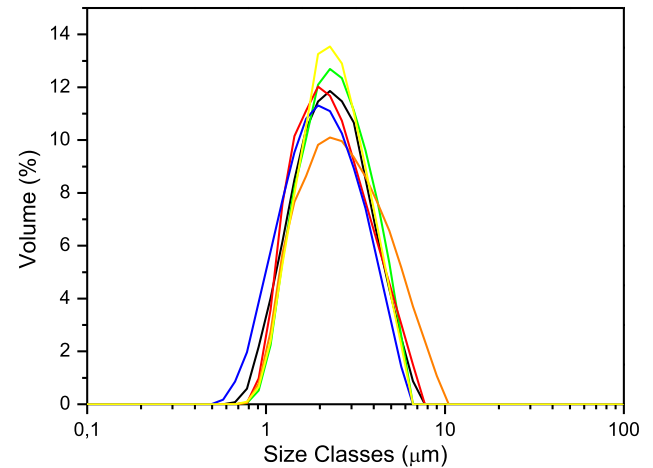


Fig. 2. Initial Particle-size distributions of W/O/W emulsions of control DE1, DE2 and respective derived boundary samples DE3, DE5 and DE8, DE10 (Table 1). DE1, Black solid line; DE3, Green solid line; DE5, Red solid line; DE2, Orange solid line; DE8, Blue solid line; DE10, Yellow solid line.

to note that particle size (d_{32}) of DE elaborated with 3% PGPR remained unchanged probably due to Pickering effect as previously discussed. Among those samples with 6% PGPR, DE10 which contained the highest Verol concentration exhibited a significant d_{32} increment over the storage time and, at the storage end (Table 3), showed a broader particle size distribution. In this latter case, the presence of fat crystals may have contributed to an increased coalescence, presumably by an Ostwald ripening effect, which can be considered a major factor in the destabilization and eventual breakdown of emulsions. The presence of larger crystals may exert a dual adverse impact on particle-size distribution and hence on the DEs physical stability: firstly, the surface area increased in this way may become insufficient to effectively cover the lipid-phase globules; secondly, larger and probably more irregularly shaped fat-crystals may irreversibly damage the O/W interface promoting coalescence. On the other hand, the presence of Pickering effects (Pickering, 1907) may have contributed to the storage stability in the other samples in which Verol was also added (particularly with 3% PGPR, as discussed previously). Pickering stabilization of DEs by fat microcrystalline particles has been reported by several authors (Frasch-Melnik et al., 2010; Garti et al., 1999; Rousseau, 2000, 2013).

In general, these behaviors can probably be explained by the aforementioned Pickering effect, which may be partially

Table 3

Mean values \pm standard deviations of Particle size (d_{32} , μm), and Emulsion stability (%) of W/O/W (DEs) emulsions along their refrigeration storage days on selected samples: DE1 and their derived samples with 3% of V10 (DE3) or V50 addition (DE5); DE2 and their derived samples with 6% of V10 (DE8) or V50 addition (DE10).

Property	DEs	Storage days			
		1	3	6	8
Particle size	DE1	1.96 \pm 0.05 ^{a,3}	2.00 \pm 0.01 ^{a,2}	1.91 \pm 0.01 ^{a,2}	1.96 \pm 0.05 ^{a,2}
	DE3	2.19 \pm 0.05 ^{a,4}	2.22 \pm 0.03 ^{a,3}	2.17 \pm 0.04 ^{a,5}	2.18 \pm 0.01 ^{a,3}
	DE5	1.94 \pm 0.02 ^{a,2}	2.01 \pm 0.07 ^{a,2}	2.02 \pm 0.01 ^{a,3}	2.01 \pm 0.07 ^{a,2}
	DE2	2.22 \pm 0.15 ^{c,4}	2.16 \pm 0.01 ^{b,3}	2.07 \pm 0.02 ^{a,4}	2.05 \pm 0.01 ^{a,2}
	DE8	1.79 \pm 0.04 ^{a,1}	1.79 \pm 0.01 ^{a,1}	1.77 \pm 0.01 ^{a,1}	1.77 \pm 0.02 ^{a,1}
Emulsion stability	DE10	2.05 \pm 0.05 ^{a,3}	2.17 \pm 0.04 ^{a-b,3}	2.15 \pm 0.03 ^{a-b,5}	2.23 \pm 0.06 ^{b,3}
	DE1	100 \pm 00 ^{c,1}	97.5 \pm 0.28 ^{b,1}	97.3 \pm 0.12 ^{b,2}	95.2 \pm 0.21 ^{a,1}
	DE3	100 \pm 00 ^{c,1}	98.6 \pm 0.32 ^{b,2}	97.8 \pm 0.31 ^{b,2-3}	96.6 \pm 0.53 ^{a,2-3}
	DE5	100 \pm 00 ^{d,1}	99.2 \pm 0.19 ^{c,2-3}	98.3 \pm 0.17 ^{b,3}	97.5 \pm 0.49 ^{a,3-4}
	DE2	100 \pm 00 ^{c,1}	97.2 \pm 0.25 ^{b,1}	96.4 \pm 0.36 ^{a,1}	96.3 \pm 0.22 ^{a,1}
	DE8	100 \pm 00 ^{d,1}	98.7 \pm 0.12 ^{c,2}	98.3 \pm 0.26 ^{b,3}	97.7 \pm 0.18 ^{a,4-5}
	DE10	100 \pm 00 ^{c,1}	99.4 \pm 0.10 ^{b,3}	99.0 \pm 0.28 ^{a-b,4}	98.6 \pm 0.26 ^{a,5}

For sample denomination see Table 1. Different letter in the same row and number in the same column indicate significant differences ($P \leq 0.05$).

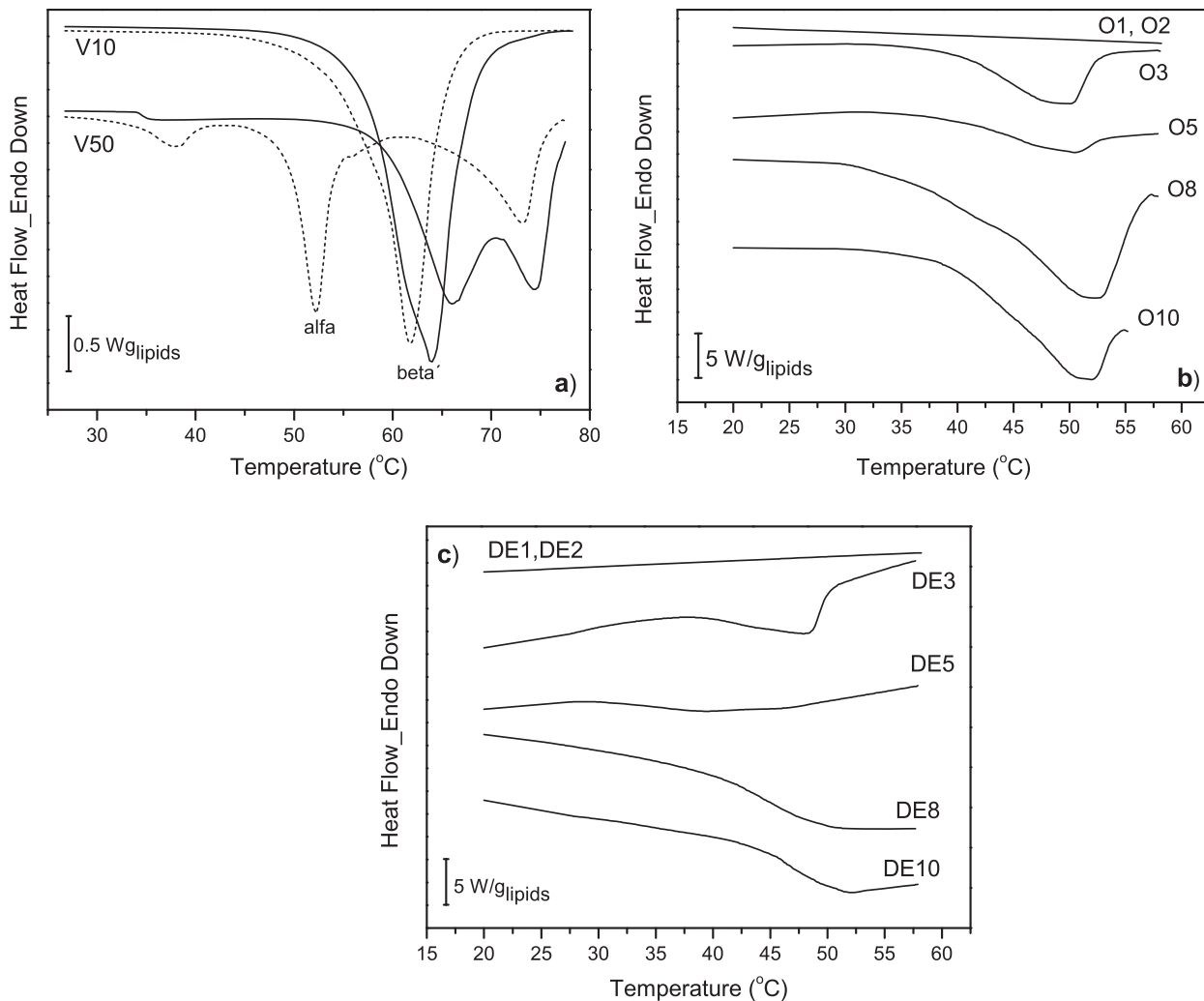


Fig. 3. Normalized DSC traces: a) Verol samples: V10; V50. Bar indicates ordinate scale (0.5 W/g_{lipids}). Solid lines, First runs; Dash lines, Second runs. b) Lipid phases: O1, O2 (Control); O3; O5; O8; O10 (Boundary Os, Table 1). Bar indicates ordinate scale (5 W/g_{lipids}). c) W/O/W emulsions: DE1; DE2 (Control); DE3; DE5; DE8; DE10 (Boundary DEs, Table 1). Bar indicates ordinate scale (5 W/g_{lipids}).

counteracted by the time-dependent appearance of an Ostwald ripening effect (Taylor, 1998) in the fat-crystals themselves. Larger crystals may exert a dual adverse impact on particle-size distribution and hence on the DEs physical stability: the surface area reduced in this way may become insufficient to effectively cover the lipid-phase globules; on the other hand, larger and probably more irregularly shaped fat-crystals may irreversibly damage the O/W interface promoting coalescence. In fact, Ostwald ripening has been considered a major factor in the destabilization and eventual breakdown of emulsions (Taylor, 1998).

3.3. Emulsion stability

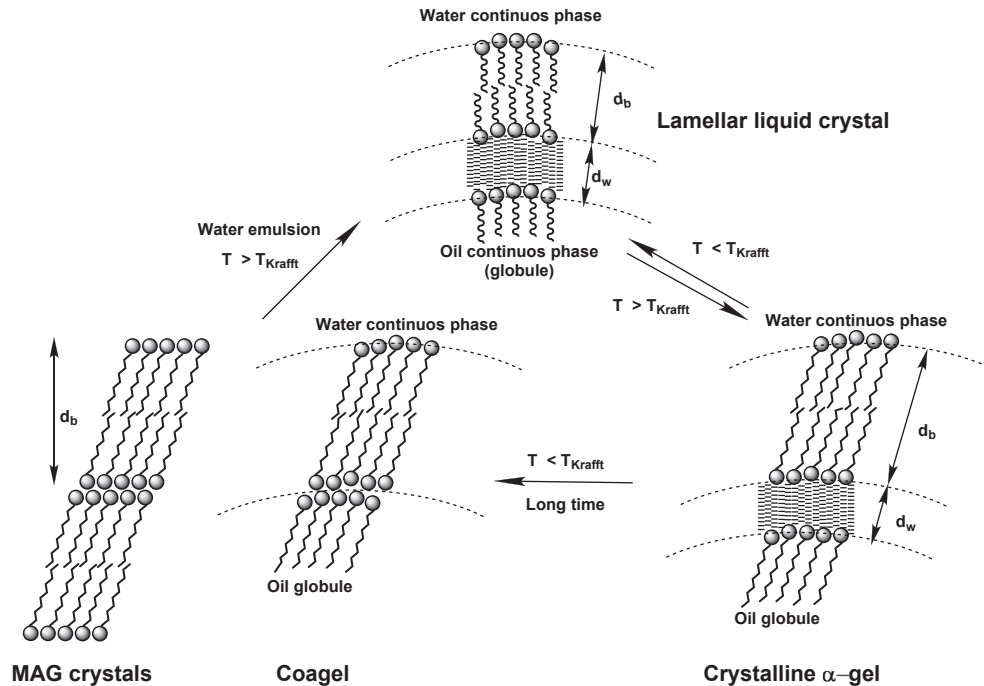
Fresh DEs showed no signs of phase separation irrespective of the formulation. Creaming of W₁/O/W₂ emulsions increased significantly with storage time, and ranged between ~2–4% at the end of storage, with the higher values in DEs formulated with no Verol components; in other words, emulsion stability evolved in the order, DE10 > DE8 ≈ DE5 > DE3, as shown in Table 3, which was consistent with the viscous character increment discussed latter on. Results were reasonable for DEs food applications that, in any case should be carried out as soon as possible after preparation. These

results were in line with others reported in previous studies (Cofrades et al., 2013; Bou et al., 2014). Table 3 shows an apparent contradiction in the behavior of sample DE10 at the end of storage: This sample significantly performed the best for emulsion physical stability but, the worst for emulsion particle size. The presence of fat crystals and their beneficial effects have been already discussed. Fat crystals may however undergo some “Ostwald ripening” effect, i.e., a relative size increase with time, along the creaming process.

3.4. Differential scanning calorimetry (DSC)

3.4.1. Verol samples

Fig. 3a shows the melting endotherms of V10 and V50. They yielded DSC traces compatible with complex mixtures of mono- and di-acylglycerides, with melting points of 55 °C and 75 °C respectively (supplier specifications). DSC traces probably reflected solid solutions (SS) developed when the melted mixtures were solidified at room temperature (low cooling rates) in the course of their production processes. V10 exhibited broad transitions (solid lines) at T_{peak} 60.5 °C, with a transition temperature interval ~25 °C (45–70 °C), and total melting enthalpy of 145 J/g_{lipids}, possibly reflecting a β'-form crystallization type. V50 exhibited a small and



Scheme 1. Illustration (highly schematic, not to scale) of the different phases (Bilayer structures and Liquid crystals) that may occur in DEs as a function of temperature relative to Kraft temperature (T_{Kraft}). MonoAcylGlyceride (MAG) (for the sake of easier drawing): Alkyl chains in all-trans conformation, Zig-zag solid lines; Carboxylic heads, Solid circles. Characteristic thicknesses: d_b , Lamellar bilayer; d_w , Water layer.

broad event centered at $\sim 39^\circ\text{C}$ with melting enthalpy of $6.5\text{ J/g}_{\text{lipids}}$ followed by a large double peak at ~ 53.5 and 74.5°C with a transition temperature interval $\sim 35^\circ\text{C}$ ($45 - 80^\circ\text{C}$) and total melting enthalpy of $110\text{ J/g}_{\text{lipids}}$. Thermal results suggested that the Verols crystallizing components could be saturated long chain acylglycerides.

3.4.2. Lipid phases

Fig. 3b shows typical and normalized DSC traces of control samples O1 and O2, and boundary samples O3 and O5, as well as O8

and O10, respectively. Flat DSC curve of the samples O1 and O2 reflected the usual thermal behavior with no transition events in the oily lipid phases. O3 exhibited a subtle formation of SS with peaks at ~ 48 and 50°C with a transition enthalpy of $\sim 2.8\text{ J/g}_{\text{lipids}}$, equivalent (Table 1) to $\sim 95\text{ J/g}_{V10}$. O5 showed SS with peaks at ~ 47 and 50.5°C with a transition enthalpy of $\sim 1\text{ J/g}_{\text{lipids}}$, equivalent (Table 1) to $\sim 25\text{ J/g}_{V50}$. O8 showed a big SS formation extending from around 30 to 60°C with a shoulder at $\sim 43^\circ\text{C}$ and major peak at 50.5°C , and $\sim 9.6\text{ J/g}_{\text{lipids}}$ of melting transition, equivalent (Table 1) to $\sim 160\text{ J/g}_{V10}$. O10 showed a big SS endotherm with a shoulder at $\sim 45^\circ\text{C}$ and major peak at 51.8°C , and $\sim 2.5\text{ J/g}_{\text{lipids}}$ of melting transition, equivalent (Table 1) to $\sim 40\text{ J/g}_{V50}$.

DSC demonstrated that Verol addition was very effective in inducing crystallization in the Olive oil, depending on the sample type (V10 or V50) and proportion (3 or 6%). Fig. 2b shows that V10 produced lower melting areas (O3 and O5) than respective V50 (O8 and O10), consistent with above compositional differences and, interestingly, 3% additions produced considerable bigger melting areas than 6%. As expected, melting transitions calculated for the Verol and % used were smaller than those determined for the single V10 and V50 mainly because of the different systems involved, with a major role of dissolution processes in the first ones.

3.4.3. Double emulsions

DEs containing Verols (Table 1) showed the thermal events depicted in Fig. 3c. DSC traces of DEs containing 3% of PGPR and V10 or V50, DE3 and DE5, had somewhat similar patterns than respective O3 and O5 lipid-phases. DE3: SS with a shoulder at $\sim 45^\circ\text{C}$ and peak at $\sim 48^\circ\text{C}$, with a melting transition enthalpy of $1.75\text{ J/g}_{\text{lipids}}$, equivalent (Table 1) to $\sim 60\text{ J/g}_{V10}$. DE5: SS with peaks at $\sim 38.5^\circ\text{C}$ and $\sim 48^\circ\text{C}$, with a melting transition enthalpy of $0.60\text{ J/g}_{\text{lipids}}$, equivalent to 20 J/g_{V50} . Enthalpy data calculated for V10 and V50 were smaller in DEs than respective Os lipid phases; apart of the bigger uncertainty in DEs because of their much smaller

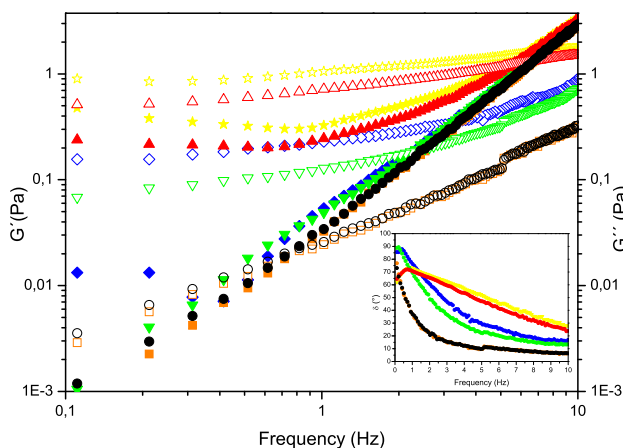


Fig. 4. Dynamic rheological data of W/O/W emulsions of DE1 and its derivatives boundary samples DE3, DE5, and DE2 and its derivatives boundary samples DE8, DE10 (Table 1): Storage module (G' , Pa), Solid symbols (axes Y1); Loss module (G'' , Pa), Open symbols (axes Y2): DE1, Black circles; DE3, Green inverted triangles; DE5, Red triangles; DE2, Orange squares; DE8, Blue rhombs; DE10, Yellow stars. Inset: Phase angle (δ , $^\circ$), Open circles: DE1, Black; DE3, Green; DE5, Red; DE2, Orange; DE8, Blue; DE10, Yellow.

presence (Table 1), majorly because of the different nucleation/crystallization phenomena in DEs relative to bulk samples.

DEs containing 6% PGPR and 6% V10 or V50 showed DSC traces morphology of DE8 and DE10 indicating that they underwent a (badly called) second order transition, i.e., their lipid phases behaved essentially as glassy matrices with glass transitions temperatures (T_g) at ~ 46 and ~ 48 °C, respectively. It is well known that synthetic polymers are semi-crystalline materials, i.e., glassy domains coexist with crystals ones but this point was not applicable to current natural products and treatments.

Interesting to note is that the small of the enthalpy data recorded pointed out to different type of phase transitions and, consequently, different type of structures, i.e., the apparition of some kind of lyotropic liquid crystalline phases (e.g., Macierzanka et al., 2009 and references there in). These liquid crystals, lyotropic mesophases will be due to a self-assembling process of current MDAG amphiphilic lipid molecules which polar heads are attracted by water while their hydrophobic chains are repelled, as high schematically illustrated in Scheme 1: MAG alkyl chains (for the sake of an easier drawing) in the bilayer lamellar crystals melt in a water dispersion at temperature above T_{Kraft} (Temperature of micellar formation), at the time that water penetrates between carboxylic, polar groups forming the bilayer lyotropic liquid crystal. It is a self-assembling process driven by hydrophobic effects. Biological membranes of milkfat globules mainly integrated by phospholipids and proteins in the presence of water (skim milk) constitute a classical example (Mulder and Walstra, 1973).

DSC results couldn't be compared due to the absence of bibliographic references.

It is interesting to emphasize that MDAG studies have been mainly dealt with by two research groups. Recent publications from the French group of Prof. Ollivon reported an interesting series of studies on the thermal and structural behavior of several dairy products by simultaneous determination of DSC and synchrotron X-ray diffraction at both wide (WAX) and small (SAX) angles. Polymorphism and structure of milk fat (mainly TAG), either in emulsion (fat globule) (Lopez et al., 2000; Lopez et al., 2001a; Lopez et al., 2002a) or in bulk (Lopez et al., 2001b; Lopez et al., 2001c) were reported, particularly after several dairy products (anhydrous milk fat, creams) were tempered at 4 °C (Lopez et al., 2002b; Bugeat et al., 2011; Lopez et al., 2005, 2007), as this is the temperature normally used in short-term food preservation. On the other hand, isothermal crystallization of milk fat (bulk and emulsified state has been reported by Fredrick et al., 2011).

Similar, the Australian group of Prof. Bhandari has recently initiated an interesting work also on the crystallization behavior of milk fat as well as on its stearin and olein (mainly TAG) fractions emulsified (micron-to nanometric-size range) in a 98% aqueous phase, using different emulsifiers (Sodium caseinate, Whey proteins concentrate, Tween80). DSC results supported by Cryogenic TEM indicated (Truong et al., 2014) the significance of a range of

effects of practical applications, that were associated with the oil phase components, the emulsifier nature, the particle size and the processing parameters (cooling rate and temperature). In a subsequent publication (Truong et al., 2015) the prior study was accomplished using 4 °C as tempering temperature of the same two milk fat fractions (stearin, olein) in both, bulk and emulsion, two droplet sizes (1.20 and 0.17 μm) and two cooling rates (1.0 and 10.0 °C/min), using SAX and WAX in addition to DSC and Cryo-TEM measurements. Crystallization of nanoemulsions required a greater supercooling degree than microemulsions indicating the effect of spatial confinement on crystal growth. Nano-sized particles with a greater droplet curvature yielded atypical morphologies in order to allow maintaining the crystal lattice; crystal dislocations facilitated the crystal accommodation into tiny spatial confinement. At the slower cooling rate the TAG molecules seemed to have more time for packing into a planar layer structure, their most thermodynamic stable one.

3.5. Viscosity

The influence of the type of Verol (V10 or V50) and level of addition (3 or 6%) on the viscosity of the different lipid phases Os used for the formation of primary emulsions as compared with the lipid phases with only PGPR (O1 or O2) was studied. Both O1 and O2 derived series behaved similar as shown in Table 3. As expected, viscosity was significantly lower in O1 and O2 than in the rest and increased depending on the addition type (V50 > V10). These results were clearly due to the presence of fat crystals in the lipid globules of the dispersed phase, which offered more resistance to viscous flow by the corresponding density increment.

Viscosity was higher in the DEs than in their respective Os but, in general, followed the same trend as their lipid phases (Table 3): DE10 > DE8 \approx DE5 > DE3. Viscosity increases of this order have been reported by others (Weiss and Muscholik, 2007). These texture increments can make DEs suitable as ingredients in the target meat area.

3.6. Dynamic rheological properties

The frequency dependence of the storage (G' , Pa) and loss (G'' , Pa) moduli of current DEs is shown in Fig. 4. All DEs showed similar behavior, typical of viscoelastic fluids. In the low frequency regime, the loss modulus G'' was higher than the storage modulus G' ($G'' > G'$), the emulsions then behaved more like viscous fluids. The storage modulus G' increased monotonically with increasing frequency, thus crossing the loss modulus (G'') curve and subsequently presenting higher values than G'' ($G' > G''$), indicating the predominance of elastic behavior at high frequencies. Additionally, there was an important difference in the cross-over points between the two moduli depending on the type of lipid phase used in the emulsions: The cross-over points occurred at frequencies lower

Table 4
Mean values \pm standard deviations of Viscosity values (Pa·s) of the different lipid phases Os and their respective DEs emulsions at 25 °C. Fitting parameters for the dynamic rheological results of corresponding DEs samples: Deformation elastic G'_0 (Pa) and viscous G''_0 (Pa) moduli, and respective exponents n' (dimensionless), n'' (dimensionless) on selected samples: DE1 and their derived samples with 3% of V10 (DE3) or V50 (DE5) addition; DE2 and their derived samples with 6% of V10 (DE8) or V50 (DE10) addition.

Sample number	Os	DEs	G'_0	n'	G''_0	n''
1	0.0434 \pm 0.0011 ¹	0.0054 \pm 0.0031 ¹	0.038	1.855	0.027	1.054
3	0.0884 \pm 0.0052 ¹	0.0301 \pm 0.0070 ²	0.048	1.764	0.134	0.6205
5	0.2899 \pm 0.0312 ²	0.0463 \pm 0.0019 ³	0.230	0.856	0.730	0.3023
2	0.0383 \pm 0.0052 ¹	0.0051 \pm 0.0005 ¹	0.034	1.905	0.024	1.086
8	0.4783 \pm 0.0455 ³	0.0469 \pm 0.0034 ³	0.087	1.458	0.238	0.4461
10	1.5266 \pm 0.0610 ⁴	0.1033 \pm 0.0121 ⁴	0.422	0.726	1.080	0.2023

For sample denomination see Table 1. Different letter in the same column indicate significant differences ($P \leq 0.05$).

than 1 Hz in DEs without any Verol addition (DE1 and DE2); while cross-over points occurred at around 2.4 and 3.2 Hz for the V10 series (DE3 and DE8, respectively), and at higher levels (5.8 and 6.8 Hz) for the V50 series (DE5 and DE10, respectively) (Fig. 4).

Phase angle (δ , °) data are shown in Fig. 4 (inset), where it is clearly illustrated the different behavior between a selection of the above samples without and with MDAG Verol additions. Obviously, viscosity (Table 4) and consistency (Fig. 4) increased as Os components had higher melting points ($V50 > V10$) and the higher the amounts added ($6\% > 3\%$). Worth noting is the presence of a peak in the δ curve of DEs containing Verols, more pronounced in the V50 series than in the V10 one, appearance the peak frequency at ~0.5 Hz in V10 samples and increased up to ~1 Hz in V50 samples. These peaks indicated the presence of some kind of transition like a phase change (presumably, Verol hydrocarbon chains melting in the lipid bilayer forming lyotropic liquid crystals, as illustrated in the above mentioned Scheme 1) which could be consistent with DSC results on the thermal behavior of the DEs involved.

Experimental G' and G'' moduli data were fitted to a power law model to derive G'_0 and G''_0 , defined as the respective resistance to elastic and viscous deformations at 1 Hz, with n' and n'' the respective exponent values (Table 4). Results of both deformation elastic and viscous moduli were lower in samples with only PGPR (DE1 or DE2), and quite similar although slightly lower in DE2. Their n' and n'' were however the highest. These samples behaved like concentrated solutions at low frequency and like weak gels at higher frequencies, indicating that the overall chain mobility within the reticular structure was still relatively high. DEs with added Verols (DE3, DE5, DE8, DE10) showed (Fig. 4) both elastic and viscous deformation moduli evolved with lower frequency dependence, and larger elastic and viscous deformation moduli (Table 4) with respect to DE1 or DE2; this indicating more stable structures ($V50 > V10$), that increased as the percentage of the respective structuring agent dose ($6 > 3\%$). Important to note is that at low frequencies (long time scales), the results will provide information on how the samples will behave during the storage and, to avoid phase separation, it is required that the elastic component (G') be of similar magnitude to (or greater than) the viscous component (G''). Fig. 4 shows that samples with 3 or 6% V50 (DE5 and DE10) can contribute to a lower phase separation (discussed above) since G' and G'' are closer at low frequencies, being then more stable ($G'' \gg G'$). Also, since these samples showed larger moduli values at higher frequencies and the elastic component dominated the viscous component, will be somewhat more consistent, in concordance with the higher viscosity values (Table 4). Exponent values n' and n'' decreased with respect to samples with only PGPR (DE1 or DE2) depending on either the kind of Verol ($V50 < V10$) and the concentration ($6 < 3\%$). This was consistent with the higher viscosity values exhibited by these kinds of samples. They were more viscous than elastic in nature.

4. Conclusions

DSC revealed that addition of MADG Verol samples produced crystallization in the oily liquid phase, and that V10 was the most effective. Use of 6% PGPR did not improve DEs quality relative to 3% PGPR, thus being a futile expense only. Additionally, 6% formulations of PGPR plus V10 or V50 were essentially amorphous in nature and consequently, aimless of stabilizing influence in W/O/W emulsions. DSC demonstrated that DEs formulated with 3% PGPR and 3 or 6% V10 or V50 showed thermal events consistent with the presence of lyotropic liquid crystals as presumably responsible to induce Pickering effects. Particle size distribution initially monomodal with d_{32} ~2 μm became coarser by the end of storage, more so in V50 than in V10. Note however, that the storage period was

excessively larger (8 days) than that optimally used in the industry (24–48 h), period in which only minor variations were detected. Consistently, creaming diminished with the use of Verols, better with 3 or 6% V10. Viscosity values increased in the order $V50 > V10$ and $6 > 3\%$, giving a relatively wide range of potentially useful textures. Rheological parameters G' and G'' were mainly affected by the type of MDAG Verol ($V50 > V10$) but barely influenced by the proportion used ($6 \approx 3\%$). Corresponding fitting parameters G'_0 and G''_0 increased in the order $V50 > V10$ and $6 > 3\%$. Generally concluding, current DEs were stable products considered of usefulness as ingredients in formulating food products with selected applications.

Acknowledgements

Funding by Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica (I + D + I), Ministerio de Economía y Competitividad, Projects AGL 2011-29644-C02-01 and AGL2014 53207-C2-1-R, and Intramural Project CSIC 201470E056. Thanks are given to Lasenor Emul S.L. for kindly supplying the Verol samples. R.B. greatly thanks his Contract JAE-postdoctoral CSIC Program financed in part by European Social Fund (ESF). M.F. greatly thanks her FPI fellowship from Ministerio de Economía y Competitividad. We thank Marta Fernández-García (ICTP-CSIC) for the English revision and Scheme drawing.

References

- Bou, R., Cofrades, S., Jiménez-Colmenero, F., 2014. Physicochemical properties and riboflavin encapsulation in double emulsions with different lipid sources. *LWT - Food Sci. Technol.* 59 (2, Part 1), 621–628.
- Bugeat, S., Briad-Bion, V., Pérez, J., Pradel, P., Martin, B., Lesieur, S., Bourgaux, C., Ollivon, M., Lopez, Ch., 2011. Enrichment in unsaturated fatty acids and emulsion droplet size affect the crystallization behavior of milk triacylglycerols upon storage at 4 °C. *Food Res. Int.* 44, 1314–1330.
- Cofrades, S., Antoniou, I., Solas, M.T., Herrero, A.M., Jiménez-Colmenero, F., 2013. Preparation and impact of multiple (water-in-oil-in-water) emulsions in meat systems. *Food Chem.* 141, 338–346.
- Dickinson, E., 2011. Double emulsions stabilized by food biopolymers. *Food Biophys.* 6, 1–11.
- Frasch-Melnik, S., Spyropoulos, F., Norton, I.T., 2010. W-1/O/W-2 double emulsions stabilised by fat crystals - formulation, stability and salt release. *J. Colloid Interf. Sci.* 350 (1), 178–185.
- Fredrick, E., Walle, Van der, Walstra, P., Zijtveid, J.H., Fisher, S., Van der Meeren, P., Dewettinck, K., 2011. Isothermal crystallization behaviour of milk fat in bulk and emulsified state. *Int. Dairy J.* 21, 685–695.
- Garti, N., Aserin, A., Tiunova, I., Binyamin, H., 1999. Double emulsions of water-in-oil-in-water stabilized by alpha-form fat microcrystals. Part 1: selection of emulsifiers and fat microcrystalline particles. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 76 (3), 383–389.
- Jiménez-Colmenero, F., 2013. Potential applications of multiple emulsions in the development of healthy and functional foods. *Food Res. Int.* 52, 64–74.
- Lopez, C., Lesieur, P., Keller, G., Ollivon, M., 2000. Thermal and structural behavior of milk fat. 1. Unstable species of cream. *J. Colloid Interf. Sci.* 229, 62–71.
- Lopez, C., Lesieur, P., Bourgaux, C., Keller, G., Ollivon, M., 2001a. Thermal and structural behavior of milk fat. 2. Crystalline forms obtained by slow cooling of cream. *J. Colloid Interf. Sci.* 240, 150–161.
- Lopez, C., Lavigne, F., Lessieur, P., Bourgaux, C., Ollivon, M., 2001b. Thermal and structural behavior of milk fat. 1. Unstable species of anhydrous milk fat. *J. Dairy Sci.* 84, 756–766.
- Lopez, C., Lavigne, F., Lessieur, P., Keller, G., Ollivon, M., 2001c. Thermal and structural behavior of milk fat. 2. Crystalline forms obtained by slow cooling. *J. Dairy Sci.* 84, 2402–2412.
- Lopez, C., Bourgaux, C., Lesieur, P., Bernadou, S., Keller, G., Ollivon, M., 2002a. Thermal and structural behavior of milk fat. 3. Influence of cream cooling rate and droplet size. *J. Colloid Interf. Sci.* 254, 64–78.
- Lopez, C., Bourgaux, C., Lesieur, P., Ollivon, M., 2002b. Crystalline structures formed in cream and anhydrous milk fat at 4 °C. *Lait* 82, 317–335.
- Lopez, C., Lesieur, P., Bourgaux, C., Ollivon, M., 2005. Thermal and structural behavior of anhydrous milk fat. 3. Influence of cooling rate. *J. Dairy Sci.* 88, 511–526.
- Lopez, C., Bourgaux, C., Lesieur, P., Ollivon, M., 2007. Coupling of time-resolved synchrotron X-ray diffraction and DSC to elucidate the crystallization properties and polymorphism of triglycerides in milk fat globules. *Lait* 87, 459–480.
- Macierzanka, A., Szelag, H., Szumala, P., Pawlowicz, R., Mackie, A.R., Ridout, M.J., 2009. Effect of crystalline emulsifier composition on structural transformations

- of water-in-oil emulsions: emulsification and quiescent conditions. *Colloid Surf. A* 334 (1–3), 40–52.
- Mulder, H., Walstra, P., 1973. *The Milk Fat Globule*. The Universities Press, Belfast (Northern Ireland).
- McClements, D.J., Decker, E.A., Weiss, J., 2007. Emulsion-based delivery systems for lipophilic bioactive components. *J. Food Sci.* 72, R109–R124.
- Muschiolik, G., 2007. Multiple emulsions for food use. *Curr Opin Colloid Interface Sci.* 12, 213–220.
- Pickering, S., 1907. Emulsions. *J. Chem. Soc.* 91, 2001–2021.
- Rousseau, D., 2000. Fat crystals and emulsion stability - a review. *Food Res. Int.* 33 (1), 3–14.
- Rousseau, D., 2013. Trends in structuring edible emulsions with Pickering fat crystals. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 18 (4), 283–291.
- Su, J., Flanagan, J., Hemar, Y., Singh, H., 2006. Synergistic effects of polyglycerol ester of polyricinoleic acid and sodium caseinate on the stabilisation of water-oil-water emulsions. *Food Hydrocoll.* 20 (2–3), 261–268.
- Taylor, P., 1998. Ostwald ripening in emulsions. *Adv. Colloid Interf.* 75 (2), 107–163.
- Truong, T., Bansai, N., Sharma, R., Palmer, M., Bhandari, B., 2014. Effects of emulsion droplet sizes on the crystallisation of milk fat. *Food Chem.* 145, 725–735.
- Truong, T., Morgan, G.P., Bansai, N., Palmer, M., Bhandari, B., 2015. Crystal structures and morphologies of fractionated milk fat in nanoemulsions. *Food Chem.* 171, 157–167.
- Weiss, J., Muschiolik, G., 2007. Factors affecting the droplet size of water-in-oil emulsions (W/O) and the oil globule size in water-in-oil-in-water emulsions (W/O/W). *J. Dispers. Sci. Technol.* 28 (5), 703–716.

APARTADO 4.1.3.

ARTÍCULO 3

Comparison of simple, double and gelled double emulsions as hydroxytyrosol and n-3 fatty acid delivery systems

Flaiz, L., Freire, M., Cofrades, S., Mateos, R., Weiss, J., Jimenez-Colmenero, F. and Bou, R. (2016). Food Chemistry **213**: 49-57.



Comparison of simple, double and gelled double emulsions as hydroxytyrosol and n-3 fatty acid delivery systems



Linda Flaiz^{a,b}, María Freire^a, Susana Cofrades^a, Raquel Mateos^a, Jochen Weiss^b, Francisco Jiménez-Colmenero^a, Ricard Bou^{a,c,*}

^a Institute of Food Science, Technology and Nutrition (ICTAN-CSIC), José Antonio Novais 10, Madrid 28040, Spain

^b Department of Food Physics and Meat Science, University of Hohenheim, Garbenstrasse 25, 70599 Stuttgart, Germany

^c Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA), XaRTA, Finca Camps i Armet, Monells 17121, Girona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 October 2015

Received in revised form 1 June 2016

Accepted 2 June 2016

Available online 16 June 2016

Keywords:

Emulsions

Double emulsion

Gelled emulsion

Hydroxytyrosol

n-3 fatty acids

Delivery systems

ABSTRACT

The purpose of this study was to compare three different emulsion-based systems, namely simple emulsion, double emulsion and gelled double emulsion, for delivery of n-3 fatty acids (perilla oil at 300 g/kg) and hydroxytyrosol (300 mg/kg). Considering that their structural differences may affect their physical and oxidative stability, this was studied by storing them at 4 °C for 22 days in the dark. The results showed that the oxidative status was maintained in all systems by the addition of hydroxytyrosol. However, there was some loss of hydroxytyrosol, mainly during sample storage and during preparation of the gelled double emulsion. Moreover, the antioxidant loss was more pronounced in more compartmentalized systems, which was attributed to their increased surface area. However, the double emulsion was found to be less stable than the gelled emulsion. Overall, the encapsulation of labile compounds in more complex systems needs to be carefully studied and adapted to specific technological and/or nutritional requirements.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

In recent years, different systems have been proposed for the delivery of hydrophobic and hydrophilic bioactive compounds in foods (Dickinson, 2012; Garti, 1997; Sagalowicz & Leser, 2010). In this context, oil-in-water (O/W) emulsions, hereafter also called simple emulsions (SEs), have been widely used for the delivery of hydrophobic compounds such as tocopherol and n-3 fatty acids in foods and beverages (Lee et al., 2006; McClements, Decker, & Park, 2009; Sagalowicz & Leser, 2010). Multiple or water-in-oil-in-water (W/O/W) double emulsions (DEs) are more complex liquid dispersions in which oil globules containing small water droplets are dispersed in an aqueous continuous phase. This type of emulsion offers a number of promising opportunities for the food industry, e.g. the delivery of hydrophobic compounds in aqueous systems, it allows for the encapsulation of hydrophilic bioactive compounds and can help improve the fat content of foods (by reducing fat and providing a healthier fatty acid profile) (Jiménez-Colmenero, 2013).

In fact the consumption and development of food products enriched with n-3 fatty acids is of great interest in the context of Western diets in view of a variety of reported beneficial health effects, mainly relating to cardiovascular and inflammatory diseases (Ruxton, Reed, Simpson, & Millington, 2004; Simopoulos, 2006). In this regard, the use of perilla oil is of special interest as it is one of the richest terrestrial sources of linolenic acid (Ciftci, Przybylski, & Rudzinska, 2012). However, systems with high n-3 fatty acid contents are prone to oxidation and hence need to be protected, since that oxidation causes loss of nutritional properties and poses a potential hazard in that various of the compounds thus formed have been associated with neurodegenerative and cardiovascular diseases (Esterbauer, Wag, & Puhl, 1993; Perluigi, Coccia, & Butterfield, 2012).

Addition of antioxidants offers a strategy to tackle this problem (Decker, Elias, & McClements, 2010b), especially if these are natural compounds. In this regard, there are some phenolic compounds that are naturally present in olive oils and have been reported to act as antioxidants (Tripoli et al., 2005). These have two advantages. Firstly, they may provide protection to food sensitive components such as n-3 fatty acids during processing and storage. And secondly, they can exert beneficial effects *in vivo* after food consumption. In this connection, hydroxytyrosol (HTy), a major

* Corresponding author at: Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA), XaRTA, Finca Camps i Armet, Monells 17121, Girona, Spain.

E-mail address: ricard.bou@irta.cat (R. Bou).

phenolic compound in olive oils (averaging 200–500 mg/kg), has recently been receiving attention for the wide range of its biological activities and its capacity to protect against cardiovascular disease (Bulotta et al., 2014; Tripoli et al., 2005). Therefore, the addition of HTy is not only of nutritional benefit when added in sufficient amounts but also of technological utility as it minimizes the oxidation extent (Cofrades et al., 2011; Pazos, Alonso, Sanchez, & Medina, 2008). Recently, Cofrades et al. (2014) studied the oxidative stability of DEs containing chia oil and HTy and that of a cooked meat system prepared with these DEs. These authors reported that DEs showed good antioxidant capacity in the early days of storage; and similarly, DEs containing HTy protected cooked meat systems against oxidation better than DEs without HTy. However, the addition of HTy appeared to exert less antioxidant effect when incorporated in this way than when added to the meat system directly. In fact it was unclear whether these differences were caused by the encapsulation itself or by a reduction in the amount of HTy, which can occur during preparation or storage of DEs as a consequence of the increased surface area. It is therefore important to know the amount of HTy that is encapsulated within the DE and how much is released and lost during preparation and storage.

Novel proposals for liquid phase oil stabilization and structuring (e.g. multiple emulsions, multilayer emulsions, Pickering stabilization) have recently been reviewed (Jiménez-Colmenero et al., 2015; Mao & Miao, 2015). A number of them can be used to improve the quality of reformulated (healthier) foods. For instance, gelled emulsions can be used in different food applications to improve their nutritional, functional and/or sensory characteristics (Li, Cheng, Tatsumi, Saito, & Yin, 2014; Lobato-Calleros et al., 2008; Weiss, Scherze, & Muschiolik, 2005). Gelled DEs (GDEs) thus offer a range of interesting possibilities for the food industry in that they may serve at once to improve the lipid composition, encapsulate bioactive compounds and provide certain plastic properties. Their physical and structural characteristics (stability, viscoelasticity, encapsulation efficiency, phase separation minimization, etc.) offer technological advantages with important effects on the desired quality attributes of foods when used as intermediate products (food ingredients) to optimize the presence of bioactive compounds. Additionally, this strategy may influence the bioavailability and oxidizability of bioactive compounds, linked as these are to their molecular structure and physicochemical properties.

Given that the physical and oxidative stability of emulsion-based systems depends on their structural differences, the aim of this study was to characterize three emulsion-based systems (SEs, DEs and GDEs) for delivery of n-3 fatty acids (perilla oil) and HTy. The oxidative stability was followed over 22 days of storage at 4 °C in the dark. It is crucial to gain an understanding of the behaviour of these systems during storage, as this needs to be considered when designing a delivery system for a particular food application. In this case it will further help to understand the changes that these potential emulsion-based delivery systems may undergo as part of a food product (e.g. meat matrix) and hence estimate how this may affect the reformulated product's characteristics. As far as the authors are aware there have been no studies on the encapsulation process of HTy in PUFA-enriched gelled DEs.

2. Material and methods

2.1. Materials and Reagents

HTy (purity $\geq 99\%$) was purchased from Seprox Biotech (Madrid, Spain) and perilla oil (fatty acid composition: 6% 16:0, 2% 18:0, 12% 18:1, 14% 18:2, 65% 18:3) was purchased from Grupo Nutracéutico Chiasa, SL (Meliana, Spain). Upon arrival this oil was

stored at 4 °C until the elaboration of the different emulsions systems (less than 1 month) and its hydroperoxide content was 0.22 ± 0.01 mmol cumene hydroperoxide/kg (Shantha & Decker, 1994). The thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) value was under the limit of detection (Cofrades et al., 2014). Sodium caseinate (Excellion EM 7) was purchased from FrieslandCampina DMV (Veghel, The Netherlands), polyglycerol polyricinoleate (PGPR) was purchased from Bavaro Chemicals S.L. (Sant Cebrià de Vallalta, Spain), gelatine (type B, 200–220 bloom) from Manuel Riesgo, S.A. (Madrid, Spain), and microbial transglutaminase (Activa GS) from Ajinomoto (Tokyo, Japan). According to the supplier the activity of the enzyme was 47–82 units of hydroxamate per g. 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox), 2,4,6-tri-(2-pyridyl)-1,3,5-triazine (TPTZ), iron(III) chloride hexahydrate, 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) and orthophosphoric acid were acquired from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). MilliQ water was used throughout. All other reagents and solvents used were of a suitable grade for spectrophotometric or chromatographic analyses.

2.2. Preparation of simple emulsions (SE), double emulsions (DE) and gelled double emulsions (GDE)

The aqueous phase (W) of the SE consisted of 0.584 g NaCl, 0.04 g sodium azide, 0.441 g sodium caseinate and 44.1 mg HTy dissolved in 100 mL distilled water. The lipid phase (O) consisted of perilla oil (94 g/100 g) plus PGPR (6 g/100 g). The simple O/W coarse emulsion was prepared by gentle addition of the lipid phase (32 g/100 g) to the outer (68 g/100 g) aqueous phase (W) in a Thermomix food processor (TM-31 Vorwerk, Wuppertal, Germany) set at 37 °C on speed 3. Sample was then passed twice through a two-stage high pressure homogenizer (Panda Plus 2000, GEA Niro Soavi, Parma, Italy) at 15 and 3 MPa (first and second stage respectively), and the SE was collected in a beaker immersed in ice. This sample is hereafter designated SE-HTy-PO. Sample aliquots were then transferred to screw-capped tubes and immediately stored at 4 °C in the dark.

A two stage procedure was used to prepare stable DEs, as reported elsewhere (Bou, Cofrades, & Jiménez-Colmenero, 2014b) with minor modifications. The inner (W_1) phase consisted of 0.584 g NaCl plus 375 mg HTy and 0.04 g sodium azide in 100 mL distilled water. The outer (W_2) phase was prepared by dispersing 0.584 g NaCl, 0.04 g sodium azide and 0.5 g sodium caseinate in 100 mL distilled water at room temperature until fully dissolved. The lipid phase (O) used was the same as in the SE. The primary coarse emulsion (W_1/O) was prepared by gentle addition of the inner (W_1) aqueous phase (20 g/100 g) to the lipid phase (80 g/100 g) in the Thermomix food processor set at 37 °C, speed 3 (700 rpm). This primary coarse emulsion was passed twice through a two-stage high pressure homogenizer (Panda Plus 1000) at 55 and 7 MPa respectively and collected in a beaker immersed in ice. The resulting primary fine emulsion (W_1/O) was immediately used for preparation of the DE by gradual addition (40 g/100 g) to the outer (60 g/100 g) aqueous phase (W_2) in the Thermomix food processor set at 37 °C, speed 3 (700 rpm). The resulting coarse $W_1/O/W_2$ emulsions were passed twice through a two-stage high pressure homogenizer (Panda Plus 1000) at 15 and 3 MPa respectively to obtain the final DE, which was collected in a beaker in ice. This sample is designated DE-HTy-PO. Sample aliquots were then transferred to screw-capped tubes and immediately stored at 4 °C in the dark. The pH of these systems was measured (1/1 v/v, sample/distilled water) using an Orion Research 720A pH meter (Instrumentación Analítica SA, Madrid, Spain). Values were in the range 6.8–7.0.

The GDEs were prepared by mixing the freshly prepared DE with gelatine (4% of the initial weight of the DE). The emulsion

was heated at 40 °C for 15 min while mixing with an overhead stirrer (AGV-8 Bunsen, Madrid, Spain) to dissolve the gelatine completely. This was then cooled down (on ice) to 35–37 °C. At this temperature, transglutaminase (2%) was added gradually while stirring for an extra 2 min after complete homogenization (15–20 min in total). This sample is designated GDE-HTy-PO. Sample aliquots were transferred to 50 mL capacity bottles, screw capped and immediately stored at 4 °C to form the final GDE in the dark. The pH of all gels was measured on a homogenate of sample in distilled water (1/1 v/v). Values ranged between 7.4 and 7.5. In order to examine the antioxidative effect of HTy in this system, a GDE without HTy was prepared and this was compared with another GDE in which the concentration of HTy in its W_1 was of 100 mg/kg.

Note that the technological aptitude should be studied in each particular food application. Accordingly, we mimicked typical refrigeration conditions in the food industry. In this connection, it is worth to mention that the physical appearance of GDE heated for 30 min at 80–90 °C was found to remain unchanged due to the formation of covalent bonds through transglutaminase activity whereas the stability of similar DE against thermal treatments has been studied previously (Bou, Cofrades, & Jimenez-Colmenero, 2014a; Bou et al., 2014b).

2.3. Microscopy

The morphology of the three systems was examined by light microscopy. After 1 and 22 days of storage at 4 °C, SE-HTy-PO and DE-HTy-PO samples were diluted 8–10 times with 5.84 g/L NaCl, placed on microscope slides and carefully covered with a cover slip just before observation. Because of its viscoelastic properties, the GDE-HTy-PO system could not readily be prepared for observation at these storage times. These samples were therefore placed on microscope slides immediately after preparation and before gelation, and carefully covered with a cover slip. They were then stored at 4 °C for 1 and 22 days. The microstructure of these emulsion-based systems was observed using a Leica AF6000 LX (Wetzlar, Germany) at 100X and 160X magnifications.

2.4. Particle size characteristics

The particle size and distribution of oil droplets in SE-HTy-PO and DE-HTy-PO samples was determined immediately after 10-fold dilution with 5.84 g/L NaCl, using a Malvern Mastersizer S particle size analyser (Malvern Instrument Ltd, Worcestershire, UK) equipped with a He-Ne laser ($\lambda = 633$ nm). The measurement range was 0.05–900 μm . Obscuration was in the range 8–15%. Particle size calculations were based on the Mie Scattering theory. Volume average diameter (d_{43}) was measured immediately after addition to the dispersion unit. Measurements were carried out in triplicate on each emulsion.

2.5. Gravitational stability

The creaming stability of SE-HTy-PO and DE-HTy-PO at 4 °C was measured in quadruplicate from 20 mL sample aliquots placed in flat-bottomed screw-capped glass tubes. The phase separation (creaming) of SE-HTy-PO and DE-HTy-PO was recorded over storage time at 4 °C in terms of phase separation and expressed as % of total sample height.

2.6. Determination of the HTy content and encapsulation efficiency and stability

In the cases of SE-HTy-PO and DE-HTy-PO, 1 mL of sample (density was checked and this is rounded to 1 g/mL) was mixed with 100 μL of 85% orthophosphoric acid. In the case of GDE-HTy-PO,

5 g of sample was homogenized using an Ultra-Turrax device (Ultra-Turrax T25, IKA-Werke, Staufen Germany) for 30 s at setting 4 (7800 rpm) with 10 mL of 15% trichloroacetic acid dissolved in methanol. Samples were then centrifuged (Consul 21 R Ortoalresa centrifuge, Madrid, Spain) at 2000g for 10 min and the supernatant was collected for analysis. HTy was analysed in the clear extract using an Agilent 1200 liquid chromatographic system equipped with an autosampler, quaternary pump and diode-array detector (DAD). A 250 mm \times 4.6 mm i.d., 5- μm particle size Nucleosil 120 RP-18 column (Teknokroma) was used, preceded by a ODS precolumn. Elution was performed at a flow rate of 1.0 mL/min, using a mixture of 1% (v/v) formic acid in deionized water (solvent A), acetonitrile (solvent B) and methanol (solvent C) as mobile phase. The solvent gradient changed from 95% A – 2.5% B – 2.5% C to 70% A – 15% B – 15% C in 25 min, to 0% A – 50% B – 50% C in 5 min, to 95% A – 2.5% B – 2.5% C in 5 min, followed by 5 min maintenance. Chromatograms were acquired at 280 nm. Injection volume was 20 μL . For quantification of HTy, a correction factor of 1.06 was applied in the GDE-HTy-PO (gelatin plus transglutaminase addition) and a standard calibration curve was prepared in a range of concentrations from 0.5 to 300 mg/kg to cover all samples. A linear response was obtained throughout the calibration range.

The recovery yield (R_y) was determined to measure the amount of HTy that was recovered in the SE-HTy-PO after preparation. This was calculated from the results in SE-HTy-PO at the initial time as follows:

$$R_y (\%) = \frac{W}{W_T} \times 100$$

where W is the amount of HTy found in the SE-HTy-PO at the initial time and W_T is the added amount of HTy (300 mg/kg).

The encapsulation efficiency (EE) for HTy in DE-HTy-PO was measured by 4-fold dilution of the DE-HTy-PO after preparation with a 5.84 g/L aqueous solution of NaCl. Samples were then centrifuged at 1300g for 15 min (Consul 21 R Ortoalresa centrifuge, Madrid, Spain) to separate the fat globules from the outer aqueous phase. Note that the centrifugation conditions did not affect the emulsion droplet size. EE was defined as the percentage of HTy remaining in the primary emulsion (W_1/O) after the second emulsification step. The amount of HTy entrapped in the DE-HTy-PO and GDE-HTy-PO was considered the compound reservoir and was calculated as follows:

$$EE (\%) = 100 - \left(\frac{W_2}{W_T} \times 100 \right)$$

where W_2 is the amount of HTy found in the outer phase of DE-HTy-PO after preparation (day 0), and W_T is the amount of HTy added (300 mg/kg).

Encapsulation stability (ES) was defined as the release of HTy during storage and was calculated with respect to the amount of HTy remaining in the primary emulsion, using the following equation:

$$ES (\%) = 100 - \left(\frac{W_{2(t)}}{W_{(t)}} \times 100 \right)$$

where $W_{(t)}$ and $W_{2(t)}$ are the total amount of HTy determined in the entire and outer phase of the DE-HTy-PO respectively, at a specific storage time (t).

2.7. Antioxidant capacity

The reducing capacity of samples during storage was determined by the FRAP assay (Pulido, Bravo, & Saura-Calixto, 2000) setup in a plate reader-based automated analysis. The reducing power of samples was measured as the increase in absorbance at

595 nm of the complex tripyridyltriazine/Fe (II) in the presence of samples containing HTy. 10 μ L of either Trolox or test sample or water as blank were added to a 96-well microplate followed by the addition of 30 μ L of distilled water and 200 μ L of 0.3 M acetate buffer, pH 3.6. A microplate reader (Bio-Tek, Winooski, VT, USA) was programmed to record every 90 s for 30 min at 595 nm after the addition of 60 μ L of FRAP reagent, which was freshly prepared by mixing 2.5 mL of a 10 mM TPTZ solution in 40 mM HCl plus 2.5 mL of 20 mM FeCl_3 and 7.5 mL of 0.3 M acetate buffer, pH 3.6. The temperature was maintained at 37 °C. Each value is the average of four determinations. Trolox was used as a standard and results were expressed as μ M of Trolox equivalents.

2.8. Lipid oxidation

Malondialdehyde content was determined in its hydrazone by high-performance liquid chromatography (HPLC) using dinitrophenylhydrazine (DNPH) for derivatization (Mateos, Goya, & Bravo, 2004). Sample aliquots (500 μ L) were weighed in Eppendorf tubes, to which 100 μ L of 6 N NaOH was added. Samples were then sealed and incubated 30 min at 60 °C. After cooling to room temperature, 250 μ L of 35% HClO_4 was added to the tubes, which were then centrifuged at 12000g for 10 min (Eppendorf, Centrifuge 5417R). A 125 μ L volume of supernatant was transferred to an Eppendorf vial and mixed with 12.5 μ L DNPH prepared as a 5 mM solution in 2 M hydrochloric acid. Finally, this reaction mixture was incubated for 30 min at room temperature protected from light. An aliquot of 50 μ L of this reaction mixture was injected onto the HPLC system. HPLC analyses were performed in an Agilent 1100 liquid chromatographic system equipped with a diode array UV–vis detector. A Nucleosil 100 RP-18 column (4.0 \times 125 mm) with 5 μ m particle size (Agilent) was used, preceded by a Lichrospher precolumn of the same material as the stationary phase (4.0 mm \times 4.0 mm). An Agilent Chemstation was used to control all the equipment software systems and perform the data processing. Elution was performed isocratically with a mixture of 0.2% (v/v) acetic acid in deionised water and acetonitrile (62:38, v/v) at a flow rate of 0.6 mL/min at room temperature. Chromatograms were acquired at 310 nm. Alternatively, the TBARS method was also used (Cofrades et al., 2014). In both cases, malondialdehyde was used as a standard and results were expressed as nmol/g or as mg/kg interchangeably.

Lipid hydroperoxides were measured by homogenizing 1 g of sample with 15 mL of chloroform/methanol (1:1, v/v) for 30 s at 4 °C. Subsequently, this solution was mixed with 3.5 mL of 0.5% NaCl and centrifuged at 3000g for 30 min at 4 °C. The content in lipid hydroperoxides was measured in the chloroform phase (or directly in perilla oil) as described elsewhere (Shantha & Decker, 1994). Cumene hydroperoxide (CHP) was used as standard and results were expressed as equivalents of mmol CHP/kg.

2.9. Instrumental colour

The colour parameters of SE-HTy-PO, DE-HTy-PO and GDE-HTy-PO were analysed throughout storage. Four sample aliquots of 30 mL were poured into Petri dishes and the surface colour of the bottom was then measured by determining L^* , a^* and b^* using a CIELab scale, where L^* is the parameter that measures lightness, b^* is the tendency towards yellow (yellowness) and a^* the tendency towards red (redness). Measurements were performed on a CR-400 Chroma Meter (Konica Minolta Business Technologies, Inc., Tokyo, Japan). The instrument was set for standard illuminant D-65 and a 2° observer, and standardized using a standard white plate.

2.10. Statistical analysis

All experiments were carried out in triplicate. Series of one-way ANOVAs were performed for each factor (emulsion-based delivery system and storage time) by fixing the other factor at each specific level in order to determine significant differences in the particle size, gravitational stability, HTy content, FRAP assay, malondialdehyde content and instrumental colour. Means were separated by Tukey's HSD test ($\alpha = 0.05$). Pearson's correlation coefficient was used to study the relationships between FRAP assay and HTy content. A T-test was carried out to determine significant differences between the initial HTy content entrapped in the core of the DE and that at the end of the storage. $P \leq 0.05$ was deemed significant in all calculations.

3. Results and discussion

3.1. Microstructure and stability

Several primary emulsions (water-in-perilla oil, W_1/O) were produced as a first step for the production of DE-HTy-PO and GDE-HTy-PO. The same emulsification conditions were used in the second step to prepare DE-HTy-PO and GDE-HTy-PO as for SE-HTy-PO. The addition of gelatine and transglutaminase to the continuous phase of the DE caused the system to gel (GDE-HTy-PO) resulting in a structured (hydrogelled) emulsion which was solid at room temperature and thermally stable due to the formation of covalent bonds. Various gelling agents have been used to form emulsions gels but, to the best of our knowledge, the use of transglutaminase to form this cold-set GDE is completely novel and because of its viscoelastic properties offers interesting opportunities for the food industry as a fat replacer (Jiménez-Colmenero et al., 2015). SE-HTy-PO samples thus differed from DE-HTy-PO and GDE-HTy-PO mainly in their compartmentalization (characteristic of the emulsion type), whereas DE samples differed from GDE-HTy-PO in their external composition and viscoelastic properties. Regardless of these differences, all these emulsion-based delivery systems were characterized by the dispersion of perilla oil in a continuous aqueous phase (Fig. 1).

In the case of SE-HTy-PO, the dispersion of small oil droplets (the majority less than 5 μ m) in a continuous aqueous phase was clearly observable (Fig. 1a) throughout the storage period (not shown). As in previous experiments (Cofrades et al., 2014), DE-HTy-PO had the characteristic compartmentalized structure (Fig. 1b and c) of this type of emulsions. In the larger droplets of DE-HTy-PO, very small water droplets were observed inside the lipid phase, which remained unchanged after 22 days of storage at 4 °C (Fig. 1c). GDE-HTy-PO was placed on slides for observation immediately after preparation and allowed to gel at 4 °C before microscopic observation the following day (Fig. 1d). This figure shows a continuous, covalently linked phase consisting of gelatine plus transglutaminase in which oil droplets seem to be closely packed. Inside the bigger droplets of GDE-HTy-PO it was also possible to see the typical DE compartmentalized structure in which small water droplets move freely inside the oil phase (See Supplementary Video). It was not possible to observe this system during storage due to evaporation of the outer aqueous phase of the prepared samples (on microscope slides), which disrupted the system. However, the appearance of the GDE-HTy-PO sample that was stored for analyses did not change over the storage period (not shown), and it therefore seems reasonable to assume that it would be as stable as DE-HTy-PO.

The particle size distributions of the SE-HTy-PO and DE-HTy-PO samples are plotted in Fig. 2. The monomodal distribution of DE-HTy-PO is consistent with previous studies dealing with other

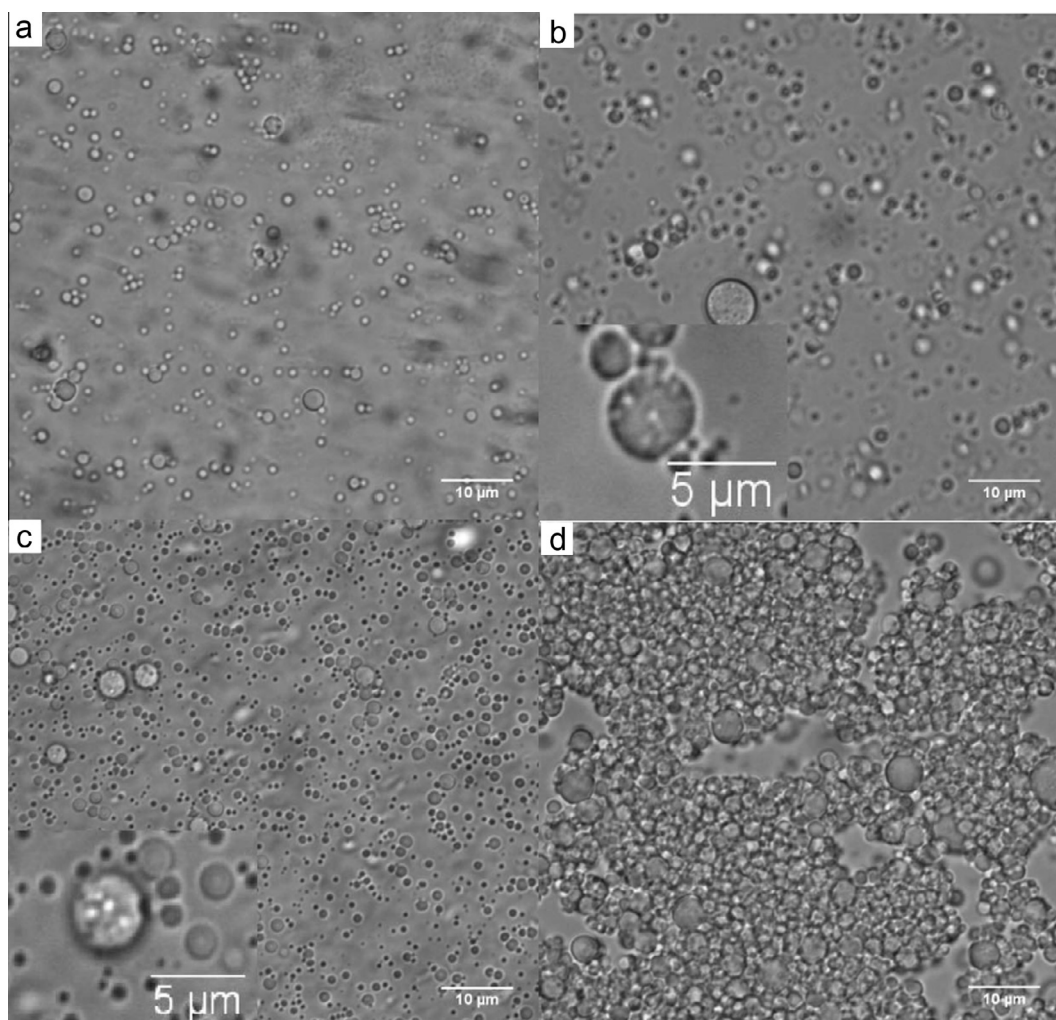


Fig. 1. Structures of the studied emulsions containing hydroxytyrosol and perilla oil stored at 4 °C: simple emulsion at day 1 (a); double emulsion at day 1 (b); double emulsion at day 22 (c) and gelled double emulsion at day 1 (d).

similar systems that differed in their lipid phases (Bou et al., 2014a, 2014b; Cofrades et al., 2014). Also, the similarities found between SE-HTy-PO and DE-HTy-PO can be accounted for the aforementioned common procedures used during the preparation of these emulsions. However, the latter were found to have a slightly narrower particle size distribution than SE-HTy-PO, especially at

the beginning of storage. After 22 days of storage at 4 °C, the particle sizes of SE-HTy-PO and DE-HTy-PO were similar to the sizes at their respective initial times although size distributions were broader, especially in the case of SE-HTy-PO.

These observations are therefore consistent with the recorded droplet sizes (d_{43}) shown in Table 1. At the initial time, SE-HTy-PO and DE-HTy-PO showed similar droplet sizes. SE-HTy-PO remained unchanged during storage. At the end of storage, the droplet size of SE-HTy-PO was greater than that of DE-HTy-PO (Table 1 and Fig. 2). The trend in the droplet size of DE-HTy-PO

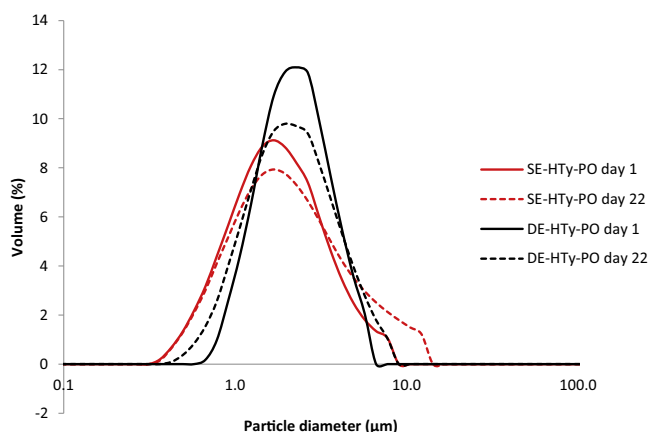


Fig. 2. Particle size distribution of simple and double emulsions after 1 day and 22 days of storage at 4 °C. See Table 1 for sample names.

Table 1

Particle size and gravitational stability of simple (SE-HTy-PO) and double (DE-HTy-PO) emulsions containing hydroxytyrosol and perilla oil.

	Day	SE-HTy-PO	DE-HTy-PO
Particle size (d_{43} ; μm)	1	2.40 ± 0.19 x	2.22 ± 0.10 ab,x
	8	2.21 ± 0.31 x	2.03 ± 0.27 a,x
	15	2.53 ± 0.19 x	2.47 ± 0.14 b,x
	22	2.49 ± 0.15 x	2.29 ± 0.16 ab,y
Gravitational stability (%)	1	100 ± 0.00 a,x	100 ± 0.00 a,x
	8	98.97 ± 0.10 b,x	98.87 ± 0.15 b,y
	15	98.41 ± 0.17 c,x	97.35 ± 0.54 c,y
	22	97.58 ± 0.26 d,x	95.60 ± 1.00 d,y

Values are means \pm standard deviation. Different letters in the same column (a, b, c, d) and in the same row (x, y, z) designate significant differences ($P \leq 0.05$).

was unclear, but in fact the values were similar at the beginning and at the end of storage. Overall, the droplet size of DE-HTy-PO was found to remain fairly constant up to 22 days of storage at 4 °C, which is enough time for a raw material to be used in the formulation of refrigerated meat and other food products. This is also consistent with findings of other authors dealing with different types of DE that had been stored for different periods at 4 °C or at room temperatures (Bonnet et al., 2009; Cofrades et al., 2014; Hattrem, Dille, Seternes, & Draget, 2014; Lutz, Aserin, Wicker, & Garti, 2009; Sapei, Naqvi, & Rousseau, 2012). Conversely, Hemar, Cheng, Oliver, Sanguansri, and Augustin (2010) reported small but significant particle size increases after 15 days of storage in DE stored at approximately 23 °C whereas Carrillo-Navas et al. (2012) reported a 25–35% increase in d_{43} after 5 months of storage at 4 °C. These storage periods and temperatures are therefore not comparable with the ones reported in this experiment.

The particle size of GDE-HTy-PO sample was not determined, as it cannot be diluted (after melting) due to the formation of a thermostable gel. However, Hattrem et al. (2014) compared DEs formulated with polysorbate 80 as a secondary emulsion emulsifier with others formulated with 20% and 30% gelatine as a hydrophilic emulsifier and gelling agent. These authors reported that the droplet size (d_{43}) of emulsions containing polysorbate 80 increased slightly during the first days and thereafter remained constant. Conversely, d_{43} remained unchanged after 90 days of storage at 20 °C in the emulsions formulated with gelatine. Therefore, it is reasonable to assume that the formation of the gel helped to maintain the droplet size of GDE-HTy-PO over the storage period.

The formation of emulsion gels offers interesting opportunities, such as fat replacement in food applications including meat products. GDE-HTy-PO remained solid throughout the storage without signs of phase separation and thus represents a clear advantage compared with other emulsion systems. In this connection, the phase separation at the end of storage was 2.4% in SE-HTy-PO and 4.4% in DE-HTy-PO (Table 1). This is a low level of phase separation given that the stability of DE-HTy-PO was comparable or even higher than reported in other studies dealing with different types of DEs (Bou et al., 2014b; Lutz et al., 2009; Sapei et al., 2012). According to Stokes' law, the phase separation depends on the viscosity of the emulsion, the difference in phase densities and the radii of the droplets. However, these parameters are relatively similar if we consider the data reported here and the preparation conditions for these systems. Because of their compartmentalization and increased interface/area ratio, DEs present considerable thermodynamic instability which is difficult to control. Therefore, those parameters that contribute to the phase separation of SEs are likely to have less influence on the overall destabilization of multiple emulsions that are less thermodynamically stable. In addition to this, the broader particle size distribution observed in SE-HTy-PO (Fig. 2) may also have been a factor in making creaming harder to visualize. Alternatively to the formation of GDE-HTy-PO, the stability of DE-HTy-PO can also be improved with the use of thickening agents (Dickinson, 2012).

3.2. HTy content, encapsulation efficiency and stability

The initial amount of HTy found in SE-HTy-PO and DE-HTy-PO samples after preparation is reported in Table 2. According to these results, the recovery yield for HTy was 99.5% and thus in line with reports for *trans*-resveratrol (95–98%) (Matos, Gutierrez, Coca, & Pazos, 2014). The HTy content found in GDE-HTy-PO was 292 mg/kg \pm 5.2, similar to DE-HTy-PO (Table 2). A DE was prepared extemporaneously to form GDE-HTy-PO which started to gel in the process of cooling down to 4 °C. After 1 day of storage, the HTy content in GDE-HTy-PO had fallen to 215 mg/kg, which may be attributed in part to the temperature applied and the

Table 2

Hydroxytyrosol content in simple (SE-HTy-PO), double (DE-HTy-PO) and gelled double (GDE-HTy-PO) emulsions.

	Day	SE-HTy-PO	DE-HTy-PO	GDE-HTy-PO
Hydroxytyrosol (mg/kg)	0	299 \pm 2 a,x	298 \pm 7 a,x	292 \pm 5 a,x ¹
	1	267 \pm 42 a,x	282 \pm 5 ab,x	215 \pm 21 b,x
	8	247 \pm 39 a,y	253 \pm 8 b,y	177 \pm 21 b,c,x
	15	251 \pm 4 a,y	222 \pm 9 c,y	179 \pm 12 b,c,x
	22	244 \pm 17 a,y	206 \pm 19 c,y	163 \pm 2 c,x

Values are means \pm standard deviation. Different letters in the same column (a, b, c, d) and in the same row (x, y, z) designate significant differences ($P \leq 0.05$).

¹ Before adding gelatine and transglutaminase.

longer time needed to mix and dissolve the gelatine and transglutaminase. Nevertheless, no differences were found in HTy content of the studied systems. From day 1 to the end of storage, HTy decreased in SE-HTy-PO, DE-HTy-PO and GDE-HTy-PO by 8.6%, 26.9% and 24.2% respectively. Thus, SE-HTy-PO seemed to be much more stable given that no significant differences were found throughout storage (Table 2). Conversely, the HTy content decreased in more compartmentalized systems (DE-HTy-PO and GDE-HTy-PO). This increased susceptibility to HTy loss contributed to lower HTy contents in GDE-HTy-PO from day 8 to the end of storage when compared with the other emulsion systems. Despite that, the variability in the HTy content likely caused there were no differences between DE-HTy-PO and SE-HTy-PO after 22 days of storage. However, when regarding HTy losses in percentage it is reasonable to think that these systems with an increased surface area (GDE and DE) may behave similarly during storage. Therefore, the HTy loss that occurred during the gel formation (from day 0 to day 1), and the increased instability in more structured systems caused a lower content of HTy in GDE-HTy-PO at the end of the storage.

The encapsulation of HTy in more compartmentalized systems, however, may offer some advantages compared to SE-HTy-PO in that HTy loss can be prevented by such encapsulation. Note that HTy encapsulation efficiency in DE-HTy-PO was 55% (Supplementary Figure). This efficiency was not improved by the addition of caseinate or gelatine in the inner water phase (data not shown). The encapsulation and release of encapsulated compounds depends on various factors including the composition and the technology used to prepare the DE as well as the nature of the encapsulated compound (Dickinson, 2011). All these factors explain the different encapsulation efficiencies for the limited number of phenolic compounds that have been encapsulated in various DEs. For instance, encapsulation efficiency for catechin has been reported to be as high as 97% (Aditya et al., 2015), whereas for *trans*-resveratrol it has been reported to range from 25% up to 40% (Matos et al., 2014). These last authors reported higher efficiencies with increased amounts of hydrophilic and hydrophobic emulsifiers (Tween 20 and PGPR respectively). In our case, the formation of a thermally stable GDE-HTy-PO made it difficult to determine whether HTy encapsulation had a synergistic effect upon the addition of gelatine and transglutaminase. However, it is reasonable to assume that HTy encapsulation efficiency was similar in DE-HTy-PO and GDE-HTy-PO, as in our case the gelation process is an additional step that occurred immediately after formation of the DE.

HTy is highly water-soluble, but because of its partition coefficient ($K_p = 0.01$) it is also partially dissolved in the oil phase (Rodis, Karathanos, & Mantzavinou, 2002). Therefore, HTy is expected to transfer from the inner to the outer aqueous phases through the lipid phase during storage and regardless of coalescence and breakdown mechanisms. Surprisingly, the encapsulation of HTy was increased from 55% to 72% ($P = 0.004$) at the end of the storage (Supplementary Figure). It is important to note that the amount

of HTy remaining within the core of the emulsion (W₁/O) stayed fairly constant throughout storage (168–149 mg/kg) and the calculation of encapsulation stability takes into account the total amount of HTy that is present in each storage period. Therefore, the main reason for this encapsulation stability increase was presumably the preferential loss of the HTy located in the outer aqueous phase. Unlike other phenolics that interact strongly with proteins, HTy has a weak affinity for typical food proteins including caseinate and gelatine (Pripp, Vreeker, & van Duynhoven, 2005). Therefore, the fact that HTy loss was smaller in GDE-HTy-PO than in DE-HTy-PO (24.2% vs 26.9%) from day 1 to day 22 supports the hypothesis that the gel network minimized HTy loss during storage by several means including physical stabilization of the emulsion, reduction of HTy diffusion to the outer phase and immobilization of pro-oxidant compounds such as transition metals.

Table 3

Ferric ion reducing antioxidant power (FRAP), malondialdehyde content and instrumental colour (L*, a*, b*) in simple (SE-HTy-PO), double (DE-HTy-PO) and gelled double (GDE-HTy-PO) emulsions.

	Day	SE-HTy-PO	DE-HTy-PO	GDE-HTy-PO
FRAP (μM)	1	3498 ± 368 a,y	3733 ± 90 a,y	2655 ± 256 a,x
	8	3454 ± 506 a,y	3521 ± 95 a,b,y	2692 ± 180 a,x
	15	3559 ± 90 a,y	3117 ± 82 c,y	2352 ± 351 a,x
	22	3289 ± 261 a,y	3136 ± 256 b,c,y	2319 ± 91 a,x
Malondialdehyde (nmol/g)	1	1.4 ± 0.51 a,x	1.3 ± 0.60 a,x	3.9 ± 0.74 a,y
	8	0.9 ± 0.26 a,x	0.4 ± 0.16 b,x	2.8 ± 0.63 a,y
	15	0.9 ± 0.75 a,x	0.3 ± 0.04 b,x	2.9 ± 0.65 a,y
	22	0.9 ± 0.56 a,x	0.3 ± 0.07 b,x	2.5 ± 0.11 a,y
Colour	L*	1 87.1 ± 1.1 a,y	84.9 ± 0.8 a,x	84.3 ± 0.8 a,x
		8 76.7 ± 0.9 b,y	72.8 ± 1.8 b,x	80.2 ± 0.5 b,z
		15 70.7 ± 1.9 c,x	70.9 ± 4.5 b,c,x	79.0 ± 0.5 c,y
		22 71.1 ± 1.4 c,y	69.2 ± 2.2 c,x	78.3 ± 0.5 d,z
	a*	1 2.5 ± 0.2 a,z	3.2 ± 0.5 y	0.5 ± 0.1 a,x
		8 3.5 ± 0.4 c,z	3.0 ± 0.4 y	0.8 ± 0.1 c,x
		15 3.5 ± 0.4 c,z	3.3 ± 0.4 y	0.8 ± 0.1 c,x
		22 2.9 ± 0.3 b,y	3.0 ± 0.6 y	0.7 ± 0.1 b,x
	b*	1 4.8 ± 0.2 a,x	5.8 ± 0.6 a,y	4.4 ± 0.2 a,x
		8 12.0 ± 0.5 b,y	13.3 ± 1.2 b,z	6.8 ± 0.6 b,x
		15 14.8 ± 0.3 c,y	15.9 ± 4.2 c,y	7.8 ± 0.3 c,x
		22 16.6 ± 1.6 d,y	16.8 ± 1.0 c,y	8.6 ± 0.4 d,x

Values are means ± standard deviation. Different letters in the same column (a, b, c, d) and in the same row (x, y, z) designate significant differences ($P \leq 0.05$).

3.3. Oxidative Stability: antioxidant capacity, malondialdehyde content and colour

The systems considered here can serve as n-3 PUFA delivery systems in different foods since they are designed to contain over 30% of perilla oil. This oil is of special interest in that it is one of the richest sources (over 60 g/100 g) of α -linolenic acid, with demonstrated preventive effects on atherosclerosis and chemically-induced cancer, and it also has beneficial effects on immune and mental functions (Jo, Kim, Lee, Kim, & Song, 2013). These systems contained over 18 g/100 g of α -linolenic acid, which is very prone to oxidation. Therefore, in addition to HTy content (Section 3.2.), antioxidant capacity, malondialdehyde content and colour were determined to assess the oxidative stability of these emulsion-based delivery systems (Table 3). At the initial time there were no differences in malondialdehyde content between SE-HTy-PO and DE-HTy-PO, whereas higher levels were recorded in GDE-HTy-PO. The initial hydroperoxide content of DE-HTy-PO and GDE-HTy-PO was 0.06 ± 0.002 and 0.16 ± 0.01 mmol CHP/kg, respectively. These results are therefore in line with the increased MDA content in the gelled system and attributed to the longer and harsher preparation conditions.

The levels of malondialdehyde in SE-HTy-PO and GDE-HTy-PO remained unchanged during storage, but they decreased in DE-HTy-PO. It is worth to mention that these results are in agreement with TBARS values (data not shown) and also with the fact that free and bound MDA are measured by means of the reported HPLC method (Grotto et al., 2009). Although MDA values decreased in DE-HTy-PO after 8 days of storage, this change (0.9 nmol/g) and the amounts found can be considered minimal if compared with other secondary oxidation decreases reported during the storage of various emulsions (Decker, Alamed, & Castro, 2010a). Besides, oxidation levels remained stable from day 8–22. Therefore, DE-HTy-PO and the other emulsions (SE-HTy-PO and GDE-HTy-PO) can be considered as stable during the whole storage. Indeed, HTy has been proved to be effective in minimizing oxidation in meat systems when this was incorporated within a similar DE (Cofrades et al., 2014). However, in order to confirm that the oxidative status maintenance throughout the storage period we decided to compare during 50 days of storage a GDE containing HTy (W₁ with 100 mg/kg) with another elaborated without this antioxidant (Fig. 3). In this experiment it can be observed that TBARS and lipid

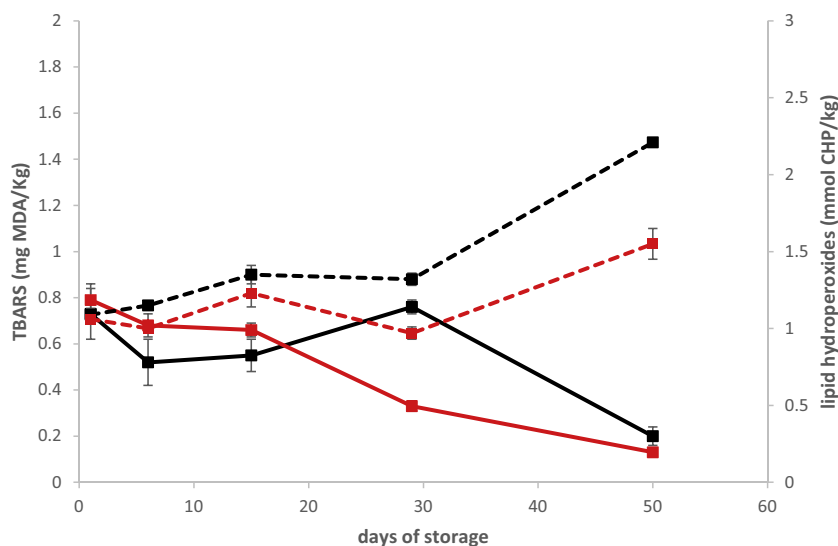


Fig. 3. Evolution of lipid hydroperoxides (segmented line) and secondary oxidation values measured by means of TBARS method (continuous line) in gelled double emulsions elaborated without hydroxytyrosol (in black) or using an inner aqueous phase containing 100 mg/kg (in red). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

hydroperoxides values of both samples remained almost unchanged until approximately 30 days. Later on TBARS values decreased in both GDE and, conversely, the content in lipid hydroperoxides increased although more markedly in the GDE without HTy. Overall, these results suggest that these systems are stable and the presence of HTy may protect from oxidation. Regarding these results, it may be advisable to monitor primary oxidation and other secondary oxidation products (e.g. hexanal and propanal) in future experiments over longer storage periods to gain a better understanding of the oxidation in these systems. Despite that, in this experiment these systems seem to be stable up to 22 days and protected by the presence of HTy. Accordingly, the observed differences in lipid oxidation and, more noticeably, in the HTy content between these systems may then be related to several phenomena mainly associated with their structural characteristics (increased surface area) and processing conditions (use of high temperatures for longer times).

The overall antioxidant capacity seemed to be mainly determined by the amount of HTy present in the different emulsions (Tables 2 and 3) as they correlated closely ($r = 0.83$). For instance, the lowest initial antioxidant capacity was recorded in GDE-HTy-PO (Table 3) which, as discussed previously, may be attributed to HTy loss during preparation. On the other hand, the presence of gelatine and transglutaminase in the GDE-HTy-PO could affect lipid oxidation. Sato, Moraes, and Cunha (2014) reported a reduction of oil oxidation in gelled emulsions in the presence of gelatine. Gelatine has the ability to adsorb on the oil/water interface and may act as a physical barrier, separating the lipid substrates from the pro-oxidants present in the aqueous phase (McClements & Decker, 2000). However, in our experimental conditions, GDE-HTy-PO had the highest initial oxidation level and therefore no such protective effect of gelatine was observed, or at least it was not enough to overcome the effect of other components such as transglutaminase. Delgado-Pando et al. (2011) reported that lipid oxidation was greater when transglutaminase was included in an oil-in-water emulsion. Additionally, the increase of oxidation values in GDE-HTy-PO may be attributed to the use of relatively high temperatures and extended times for complete solubilisation of gelatine during the preparation of GDE-HTy-PO, as opposed to the preparation conditions used to form SE-HTy-PO and DE-HTy-PO, which did not require additional heating. Cofrades et al. (2014) reported that some degree of oxidation occurs during the production of DEs, stressing the desirability of protecting the lipid phase with antioxidant-enriched DEs. This can be prevented by the addition of HTy, although processing conditions need to be optimized for minimum loss of HTy and maximum protection of n-3 fatty acids.

The largest decrease in antioxidant capacity during storage was observed in DE-HTy-PO (Table 3), presumably associated with the increased susceptibility to oxidation in more compartmentalized systems as noted above. Oxidation has been reported to be mainly initiated at the interface by interaction between pro-oxidant factors and the lipids to be oxidized (Decker et al., 2010b; McClements & Decker, 2000). Oxygen and edible oil react more promptly when the oil droplet size is small or has a high surface to volume ratio, as in the case of emulsions (Sato et al., 2014). Therefore, the higher HTy loss and lower antioxidant capacity found in DE-HTy-PO and GDE-HTy-PO may be related to the increase in the interface area/volume ratio of these emulsions. As in the present experiment, Cofrades et al. (2014) found that TBARS levels in DEs with HTy decreased during storage. These authors reported that oxidation levels over storage were lower than in the same emulsions without HTy, demonstrating the antioxidative effect of HTy. The location and slow release of HTy reservoir into the lipid phase may be responsible for inhibiting oxidation during storage. The maintenance (or minimal decrease) of malondialde-

hyde during storage with FRAP values and HTy loss, suggesting that the latter serves to protect other food components. The results evidence the antioxidant potency of HTy, which maintained high levels after 22 days of storage (Table 2), protecting n-3 fatty acids against oxidation as shown by the malondialdehyde content. Therefore, these delivery systems containing HTy can help to prevent oxidation when used as functional ingredients.

Colour is an important characteristic of delivery systems since it may influence the final appearance of the food product in which they are used and hence determine its overall acceptability. At the outset, all the systems containing n-3 fatty acids and HTy presented a similar colour. In spite of this, the initial L^* , a^* and b^* values of these emulsions were found to be affected by the type of system (Table 3). This means that the specific composition, preparation conditions and oxidation status may have contributed to the final colour of the emulsions. Lightness was found to decrease under storage, whereas yellowness did the opposite. However, there was no clear trend in the case of redness. Therefore, it seems reasonable to suppose that the onset of oxidation associated with HTy loss and the further transformation into brownish quinones contributed to these colour changes and should be taken into account when using these delivery systems in real food samples.

4. Conclusions

The simultaneous incorporation of n-3 fatty acids and HTy in foods can be achieved by means of several types of emulsions possessing different characteristics. The development of more complex systems may offer some interesting advantages such as encapsulation of bioactive compounds (e.g. DEs) and/or desired plastic properties (e.g. GDEs). From a physical point of view, all systems were shown to be stable and the addition of 300 mg/kg HTy efficiently protected n-3 fatty acid-enriched emulsions from oxidation. However, antioxidant capacity diminished with storage, and there were also colour changes possibly related to the onset of oxidation. HTy loss mainly occurred during preparation of GDE-HTy-PO and during storage in all of them. This antioxidant loss progressed faster in more compartmentalized systems (DE-HTy-PO and GDE-HTy-PO), which was attributed to their increased surface area. However, the formation of GDE-HTy-PO may minimize this loss during storage when compared with DE-HTy-PO. Therefore, when using DEs the encapsulation of labile compounds needs to be considered and adapted to specific technological and/or nutritional requirements.

Conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgements

R. Bou has been in part supported by a contract from the JAE-postdoctoral (CSIC) Program financed in part through the European Social Fund (ESF) and through the Ramon y Cajal Program. This research has been supported by project AGL 2011-29644-C02-01 from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.06.005>.

References

- Aditya, N. P., Aditya, S., Yang, H., Kim, H. W., Park, S. O., & Ko, S. (2015). Co-delivery of hydrophobic curcumin and hydrophilic catechin by a water-in-oil-in-water double emulsion. *Food Chemistry*, 173, 7–13.
- Bonnet, M., Cansell, M., Berkaoui, A., Ropers, M. H., Anton, M., & Leal-Calderon, F. (2009). Release rate profiles of magnesium from multiple W/O/W emulsions. *Food Hydrocolloids*, 23, 92–101.
- Bou, R., Cofrades, S., & Jimenez-Colmenero, F. (2014a). Influence of high pressure and heating treatments on physical parameters of water-in-oil-in-water emulsions. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 23, 1–9.
- Bou, R., Cofrades, S., & Jimenez-Colmenero, F. (2014b). Physicochemical properties and riboflavin encapsulation in double emulsions with different lipid sources. *LWT-Food Science and Technology*, 59, 621–628.
- Bulotta, S., Celano, M., Lepore, S. M., Montalcini, T., Pujia, A., & Russo, D. (2014). Beneficial effects of the olive oil phenolic components oleuropein and hydroxytyrosol: Focus on protection against cardiovascular and metabolic diseases. *Journal of Translational Medicine*, 12.
- Carrillo-Navas, H., Cruz-Olivares, J., Varela-Guerrero, V., Alamilla-Beltran, L., Vernon-Carter, E. J., & Perez-Alonso, C. (2012). Rheological properties of a double emulsion nutraceutical system incorporating chia essential oil and ascorbic acid stabilized by carbohydrate polymer-protein blends. *Carbohydrate Polymers*, 87, 1231–1235.
- Ciftci, O. N., Przybylski, R., & Rudzinska, M. (2012). Lipid components of flax, perilla, and chia seeds. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 114, 794–800.
- Cofrades, S., Salcedo Sandoval, L., Delgado-Pando, G., López-López, I., Ruiz-Capillas, C., & Jimenez-Colmenero, F. (2011). Antioxidant activity of hydroxytyrosol in frankfurters enriched with n-3 polyunsaturated fatty acids. *Food Chemistry*, 129, 429–436.
- Cofrades, S., Santos-Lopez, J. A., Freire, M., Benedi, J., Sanchez-Muniz, F. J., & Jimenez-Colmenero, E. (2014). Oxidative stability of meat systems made with W1/O/W2 emulsions prepared with hydroxytyrosol and chia oil as lipid phase. *LWT-Food Science and Technology*, 59, 941–947.
- Decker, E. A., Alamed, J., & Castro, I. A. (2010a). Interaction between polar components and the degree of unsaturation of fatty acids on the oxidative stability of emulsions. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 87, 771–780.
- Decker, E. A., Elias, R. J., & McClements, D. J. (2010b). *Oxidation in foods and beverages and antioxidant applications*. Philadelphia, PA: Woodhead Publishing.
- Delgado-Pando, G., Cofrades, S., Ruiz-Capillas, C., Solas, M. T., Triki, M., & Jimenez-Colmenero, F. (2011). Low-fat frankfurters formulated with a healthier lipid combination as functional ingredient: microstructure, lipid oxidation, nitrite content, microbiological changes and biogenic amine formation. *Meat Science*, 89, 65–71.
- Dickinson, E. (2011). Double emulsions stabilized by food biopolymers. *Food Biophysics*, 6, 1–11.
- Dickinson, E. (2012). Emulsion gels: The structuring of soft solids with protein-stabilized oil droplets. *Food Hydrocolloids*, 28, 224–241.
- Esterbauer, H., Wag, G., & Puhl, H. (1993). Lipid peroxidation and its role in atherosclerosis. *British Medical Bulletin*, 49, 566–576.
- Garti, N. (1997). Double emulsions – Scope, limitations and new achievements. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 123, 233–246.
- Grotto, D., Maria, L. S., Valentini, J., Paniz, C., Schmitt, G., Garcia, S. C., ... Farina, M. (2009). Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects for malondialdehyde quantification. *Quimica Nova*, 32(1), 169–174.
- Hattrem, M. N., Dille, M. J., Seternes, T., & Draget, K. I. (2014). Macro- vs. micromolecular stabilisation of W/O/W-emulsions. *Food Hydrocolloids*, 37, 77–85.
- Hemar, Y., Cheng, L. J., Oliver, C. M., Sanguansri, L., & Augustin, M. (2010). Encapsulation of resveratrol using water-in-oil-in-water double emulsions. *Food Biophysics*, 5, 120–127.
- Jimenez-Colmenero, F. (2013). Potential applications of multiple emulsions in the development of healthy and functional foods. *Food Research International*, 52, 64–74.
- Jimenez-Colmenero, F., Salcedo-Sandoval, L., Bou, R., Cofrades, S., Herrero, A. M., & Ruiz-Capillas, C. (2015). Novel applications of oil-structuring methods as a strategy to improve the fat content of meat products. *Trends in Food Science and Technology*, 44, 177–188.
- Jo, H., Kim, M., Lee, J., Kim, H., & Song, Y. O. (2013). Anti-atherogenic properties of emulsified perilla oil (EPO) in apo E KO mice and plasma lipid lowering effects of rice porridge containing EPO in healthy young adults. *Food Science and Biotechnology*, 22, 79–85.
- Lee, S., Hernandez, P., Djordjevic, D., Faraji, H., Hollender, R., Faustman, C., & Decker, E. A. (2006). Effect of antioxidants and cooking on stability of n-3 fatty acids in fortified meat products. *Journal of Food Science*, 71, C233–C238.
- Li, J., Cheng, Y., Tatsumi, Y., Saito, M., & Yin, L. (2014). The use of W/O/W controlled-release coagulants to improve the quality of bittern-solidified tofu. *Food Hydrocolloids*, 35, 627–635.
- Lobato-Calleros, C., Sosa-Perez, A., Rodriguez-Tafoya, J., Sandoval-Castilla, O., Perez-Alonso, C., & Vemon-Carter, E. J. (2008). Structural and textural characteristics of reduced-fat cheese-like products made from W-1/O/W-2 emulsions and skim milk. *LWT-Food Science and Technology*, 41, 1847–1856.
- Lutz, R., Aserin, A., Wicker, L., & Garti, N. (2009). Release of electrolytes from W/O/W double emulsions stabilized by a soluble complex of modified pectin and whey protein isolate. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 74, 178–185.
- Mao, L., & Miao, S. (2015). Structuring food emulsions to improve nutrient delivery during digestion. *Food Engineering Reviews*, 1–13.
- Mateos, R., Goya, L., & Bravo, L. (2004). Determination of malondialdehyde by liquid chromatography as the 2,4-dinitrophenylhydrazine derivative – A marker for oxidative stress in cell cultures of human hepatoma HepG2. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 805, 33–39.
- Matos, M., Gutierrez, G., Coca, J., & Pazos, C. (2014). Preparation of water-in-oil-in-water (W-1/O/W-2) double emulsions containing trans-resveratrol. *Colloids and Surfaces A-Physicochemical and Engineering Aspects*, 442, 69–79.
- McClements, D. J., & Decker, E. A. (2000). Lipid oxidation in oil-in-water emulsions: Impact of molecular environment on chemical reactions in heterogeneous food systems. *Journal of Food Science*, 65, 1270–1282.
- McClements, D. J., Decker, E. A., & Park, Y. (2009). Controlling lipid bioavailability through physicochemical and structural approaches. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 49, 48–67.
- Pazos, M., Alonso, A., Sanchez, I., & Medina, I. (2008). Hydroxytyrosol prevents oxidative deterioration in foodstuffs rich in fish lipids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 3334–3340.
- Perluigi, M., Coccia, R., & Butterfield, D. A. (2012). 4-Hydroxy-2-nonenal, a reactive product of lipid peroxidation, and neurodegenerative diseases: A toxic combination illuminated by redox proteomics studies. *Antioxidants and Redox Signaling*, 17, 1590–1609.
- Pripp, A. H., Vreeker, R., & van Duynhoven, J. (2005). Binding of olive oil phenolics to food proteins. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, 354–362.
- Pulido, R., Bravo, L., & Saura-Calixto, F. (2000). Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(8), 3396–3402.
- Rodis, P. S., Karathanos, V. T., & Mantzavinou, A. (2002). Partitioning of olive oil antioxidants between oil and water phases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 596–601.
- Ruxton, C. H. S., Reed, S. C., Simpson, M. J. A., & Millington, K. J. (2004). The health benefits of omega-3 polyunsaturated fatty acids: A review of the evidence. *Journal of Human Nutrition and Dietetics*, 17, 449–459.
- Sagalowicz, L., & Leser, M. E. (2010). Delivery systems for liquid food products. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 15, 61–72.
- Sapei, L., Naqvi, M. A., & Rousseau, D. (2012). Stability and release properties of double emulsions for food applications. *Food Hydrocolloids*, 27, 316–323.
- Sato, A. C. K., Moraes, K. E. F. P., & Cunha, R. L. (2014). Development of gelled emulsions with improved oxidative and pH stability. *Food Hydrocolloids*, 34, 184–192.
- Shantha, N. C., & Decker, E. A. (1994). Rapid, sensitive, iron-based spectrophotometric methods for determination of peroxide values of food lipids. *Journal of AOAC International*, 77(2), 421–424.
- Simopoulos, A. P. (2006). Evolutionary aspects of diet, the omega-6/omega-3 ratio and genetic variation: Nutritional implications for chronic diseases. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 60, 502–507.
- Tripoli, E., Giammanco, M., Tabacchi, G., Di Majo, D., Giammanco, S., & La Guardia, M. (2005). The phenolic compounds of olive oil: Structure, biological activity and beneficial effects on human health. *Nutrition Research Reviews*, 18, 98–112.
- Weiss, J., Scherze, I., & Muschiolik, G. (2005). Polysaccharide gel with multiple emulsion. *Food Hydrocolloids*, 19, 605–615.

APARTADO 4.1.4.

ARTÍCULO 4

Technological characteristics of cold-set gelled double emulsion enriched with n-3 fatty acids: Effect of hydroxytyrosol addition and chilling storage

Freire, M., Bou, R., Cofrades, S. and Jiménez-Colmenero, F. (2017). Food Research International. **100** (2): 298-305



Technological characteristics of cold-set gelled double emulsion enriched with n-3 fatty acids: Effect of hydroxytyrosol addition and chilling storage

María Freire^{a,*}, Ricard Bou^b, Susana Cofrades^a, Francisco Jiménez-Colmenero^a

^a Institute of Food Science, Technology, and Nutrition (ICTAN-CSIC), 28040 Madrid, Spain

^b Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA), XaRTA, Finca Camps i Armet, Monells 17121, Girona, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Gelled double emulsion
Hydroxytyrosol
n-3 fatty acid
Chilling storage
Lipid stability
Technological properties

ABSTRACT

A study was carried out to analyse the technological characteristics and microbiological content of gelled double emulsions (GDE) formulated with perilla oil (as lipid phase and source of n-3 fatty acids) combined or not with hydroxytyrosol (Hyt) (in the inner aqueous phase) over 30 days storage at 4 °C. Both the control sample without Hyt (GDE-C) and the sample containing Hyt (GDE-Hyt) had an appropriate whitish solid-like structure with rheological (elastic and viscous moduli, and phase angle) and textural (hardness and chewiness) properties of strong gels. In comparison with GDE-C, the presence of Hyt promoted the formation of weaker gels, as evidenced by lower hardness and chewiness values and elastic modulus. Overall, GDEs presented excellent water and fat binding properties irrespective of the formulation and storage time. Changes in hydroperoxides and TBARS contents over storage indicated that GDEs were little prone to oxidation after 30 days. Nevertheless, Hyt increased GDE antioxidant capacity by up to 12 times after preparation, although this declined with storage. Most of the antimicrobial activity of Hyt was observed during the first two weeks of storage.

1. Introduction

Over the last several years novel applications of unsaturated liquid oil structuring methods have been considered as a strategy to improve the fat content of foods. Various different approaches have been proposed to stabilize and structure edible oils to promote solid-lipid functionality for use as an alternative to (semi-solid) animal fat in the development (reformulation) of healthy lipid foods, including meat products (Jiménez-Colmenero et al., 2015; Mao & Miao, 2015). In this regard gelled emulsions, a complex colloidal material where emulsion and gel structures co-exist, offer interesting possibilities for use as food ingredients with novel functional properties and many industrial applications (Dickinson, 2011; Mao & Miao, 2015; McClements, 2012).

Although different simple emulsion gels have been described in the literature, there have been relatively few studies dealing with the development of gelled double emulsions (Benna-Zayani, Kbir-Ariguib, Trabelsi-Ayadi, & Grossiord, 2008; Delample, Da Silva, & Leal-Calderon, 2014; Patel et al., 2015), and still less involving their use as potential animal fat replacers. Gelled water-in-oil-in-water (W/O/W) double emulsions (GDEs) are a particular type of structured emulsions which offer a number of promising opportunities for food applications. These novel lipid materials can be used to improve lipid composition

(reducing fat and providing a healthier fatty acid profile) of foods and encapsulate bioactive (hydrophilic and lipophilic) compounds while providing certain plastic properties. The inclusion of different emulsifiers and the oil and water phase composition are important factors in the final double emulsion (DE) characteristics, but when these systems are also intended to stabilize and structure a soft solid, the embedding of the emulsion droplets within a continuous hydrogel matrix seems the most promising strategy (Jiménez-Colmenero et al., 2015). Such structured hydrogelled double emulsions are typically formed in a two-step procedure: first, a double emulsion (liquid-like) is produced which, in a second step, is transformed into a solid-like emulsion gel by gelling the continuous phase and/or aggregating the emulsion droplets by thermal, enzymatic or chemical means (Dickinson, 2011; Jiménez-Colmenero et al., 2015; Mao & Miao, 2015). In this regard, we are seeing continuous advances based on traditional emulsifiers (proteins, polysaccharides) and novel complex emulsifiers (Liu et al., 2017).

One novel structuring proposal in the context of technological strategies to improve the fatty acid profile of foods is the development of GDEs enriched with n-3 fatty acid. While a number of different oils can be used for this purpose, perilla oil combined with a natural antioxidant such as hydroxytyrosol (Hyt) is especially promising (Flaiz et al., 2016). This is because perilla oil is one of the richest existing

Abbreviations: MTG, microbial transglutaminase; Hyt, hydroxytyrosol; GDE, gelled double emulsions; DE, double emulsion

* Corresponding author.

E-mail address: maria.freire@ictan.csic.es (M. Freire).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2017.08.047>

Received 5 May 2017; Received in revised form 17 August 2017; Accepted 18 August 2017

Available online 19 August 2017

0963-9969/ © 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

sources of α -linolenic acid (containing over 18 g/100 g of GDE), with demonstrated preventive effects on atherosclerosis and chemically-induced cancer, and also beneficial effects on immune and mental functions (Jo, Kim, Lee, Kim, & Song, 2013). For its part, Hyt is a phenolic compound (occurring naturally in olive oil) which has recently been receiving attention because of its wide range of biological and technological activities, including antioxidant and antimicrobial effects in foods and protection against cardiovascular diseases (Cofrades, López-López, & Jiménez-Colmenero, 2011; Medina-Martínez, Truchado, Castro-Ibanez, & Allende, 2016; Pazos, Alonso, Sánchez, & Medina, 2008). While different ingredients (pectin, alginate, gellan gum, etc.) have been added to the continuous phase (outer aqueous phase of DEs) to assist gelling and form the emulsions gels (Dickinson, 2011; Jiménez-Colmenero et al., 2015; Mao & Miao, 2015), with a combination of gelatin and microbial transglutaminase, a thermally stable structured cold-set double emulsion gel (hydrogelled) can be achieved with solid-like properties at room temperature (Flaiz et al., 2016).

Although several aspects of the preparation of GDE delivery systems containing Hyt and n-3 fatty acids have been studied (Cofrades et al., 2017; Flaiz et al., 2016), the presence of Hyt in GDE and its interaction with other components of the system needs to be addressed to understand its effect on physicochemical and microbiological characteristics, as well as its behaviour over storage of GDEs. The addition of Hyt is expected to have a considerable influence on the quality and stability of newly-formulated products. A deeper understanding of GDE technological characteristics will facilitate their use as food ingredients and thus help to further elucidate their role when incorporated as fat analogues in the meat matrix structure to obtain healthy food systems.

As a contribution to the successful development of GDEs as food-grade delivery systems with desirable (composition and solid-lipid) characteristics, this study aimed to characterize the technological (rheological, textural, colour, etc.) and microbiological properties of GDEs formulated with perilla oil (as lipid phase and source of n-3 fatty acids) as affected by the presence of Hyt (incorporated in the inner aqueous phase). These characteristics can also be affected during chilled storage given the nature of these new systems and that of the products to which they are added, and therefore these processing conditions were also studied.

2. Material and methods

2.1. Formulation and preparation of gelled double ($W_1/O/W_2$) emulsions (GDEs)

GDEs were prepared as reported in Flaiz et al. (2016). Briefly, a double emulsion (DE) was prepared in a 2-step emulsification procedure. The inner aqueous phase (W_1) consisted of 0.584 g NaCl (Panreac Quimica S.A., Barcelona, Spain) 125 mg Hyt (Seproxx Biotech S.L., Madrid, Spain) and 0.04 g sodium azide (Panreac Quimica S.A., Barcelona, Spain) dissolved in 100 mL distilled water. The external aqueous phase (W_2) consisted of 0.5 g sodium caseinate (Excellion EM 7, FrieslandCampina DMV, Veghel, the Netherlands), 0.584 g NaCl and 0.04 g sodium azide dissolved in 100 mL distilled water. The lipid phase (O) consisted of 6 g polyglycerol ester of polyricinoleic acid (PGPR; Lasenor Emul S.L., Olesa de Montserrat, Spain) in 100 g perilla oil (NutraZell Perilla, Grupo Nutraceutico ChiaSa, S.L., Meliana, Spain). In the first step, a primary emulsion (W_1/O ; 20/80) was prepared using a two-stage high pressure homogenizer (Panda Plus 2000, GEA Niro Soavi, Parma, Italy) and the emulsion was homogenized twice at 7/55 MPa (first-stage pressure/second-stage pressure). The DE was formed by mixing 40 g/100 g W_1/O with 60 g/100 g W_2 and homogenized twice in a two-stage high pressure homogenizer at 3.5/15 MPa. Similarly, a DE without Hyt in the W_1 was prepared as control. Gelation was achieved by mixing the freshly prepared DEs with 4% bovine gelatine (200–220 bloom. Manuel Riesgo, S.A. Madrid, Spain) dissolved at 40 °C and 2% microbial transglutaminase (MTG; Activa GS, Ajinomoto

(Tokyo, Japan). The two systems were rapidly aliquoted (40 g) in tubes (50 mL capacity), which were screw-capped and kept for 24 h at 4 °C to form the final two GDEs: the control sample without Hyt (GDE-C) and the sample containing 300 mg Hyt/kg (GDE-Hyt). These GDEs were stored in darkness at 4 °C until analysis (0, 8, 15, 30 days). These systems were fully replicated.

2.2. Particle size and distribution of oil droplets

These parameters were determined (in triplicate) in the DEs with a Malvern Mastersizer S laser diffraction particle size analyzer (Malvern Instrument Ltd., Worcestershire, UK) equipped with a He-Ne laser ($\lambda = 633$ nm). The measurement range was 0.05–900 μ m. Obscuration range was 8–15%. Particle size calculations were based on the Mie Scattering theory. Volume average diameter ($d_{4,3}$), (Tepsongkroh, Harnsilawat, Maisuthisakul, & Chantrapornchai, 2015) was measured immediately after 10-fold dilution with the same saline composition as the outer phase of the W/O/W, and immediately read after placing in the dispersing unit filled with deionized water. Particle size measurements were performed at room temperature. Particle size was not determined in the GDEs given that these are thermostable gels (Flaiz et al., 2016). The pH of the DEs was measured previously as reported in Section 2.5 and was not expected to change during measurement.

2.3. Dynamic rheological properties

Dynamic rheological analyses were performed using a controlled-stress Bohlin CVO-100 rheometer (Bohlin Instruments Ltd., Gloucestershire, UK). The measurement system was a circular plate geometry PP20 (20 mm diameter) with a 1 mm gap for all samples. Emulsion gels were cut from graduated plastic tubes into disk-shaped slices 20-mm diameter and 1-mm thick with a stainless steel cell specially designed for this diameter (Canet, Fernández, & Alvarez, 2009). A film of Vaseline oil (Codex purissimum) was gently applied to the edge of each sample to prevent moisture losses. Amplitude sweeps, to determine the linear viscoelastic (LVE) region, were conducted by varying the shear strain (γ) of the input signal from 0.001 to 1% at a frequency of 1 Hz. Samples were subjected to stress that varied harmonically with time at variable frequencies from 0.1 to 10 Hz. The strain amplitude was set at $\gamma = 0.5\%$ within the LVE range. The elastic modulus (G' ; Pa) and the viscous modulus (G'' ; Pa) were plotted as functions of frequency. Samples were allowed to relax for 4 min before performing rheological tests such as equilibration time. Measurements were made at 25 °C since it is worth noting that lipids that are solid in the range of 20–25 °C are considered fats whereas those that are melted at these temperatures are typically referred to as oils. Since we aimed to mimic solid-fat characteristics, we studied rheological properties at room temperature.

Also, a temperature sweep was conducted from 20 to 80 °C at a heating rate of 1 °C with a frequency of 1 Hz at a constant strain of 0.5% (within the LVE range). Elastic modulus (G'), viscous modulus (G'') and phase angle (δ ; °) were calculated with the analysis program software. Results were averages of three determinations.

Rheological analyses were conducted on GDE-C and GDE-Hyt at the beginning and at the end of storage (30 days at 4 °C).

2.4. Texture profile analysis

Texture profile analysis was performed with a TA.XTplus Texture Analyzer (Texture Technologies Corp., Scarsdale, NY, USA) as described by (Bourne, 1978). Six cores (20 mm height; 30 mm diameter) for each sample (GDE-C and GDE-Hyt) were axially compressed to 50% of their original height. Force–time deformation curves were obtained with a 5 kg load cell applied at a crosshead speed of 1 mm s^{−1}. Attributes were calculated as described by Freire, Bou, Cofrades, Solas, and Jiménez-Colmenero (2016).

2.5. Instrumental colour and pH

CIE-LAB tristimulus values were measured on DGE cross-sections (ten determinations per sample) using a 3500d spectrophotometer (Konica Minolta Business Technologies, Tokyo, Japan). Colour was monitored using a computerized system controlled by Spectra Magic software (Konica Minolta Sensing, Inc.).

In order to better characterize these GDE o GDE, the pH was determined five times on 10 g of sample homogenate in 100 mL distilled water using an Orion Research720A pH meter (Instrumentación Analítica SA, Madrid, Spain).

2.6. Gravitational and thermal stability

The aliquoted tubes containing the gelled double emulsion (40 g) were opened and left to stand upside down for 30 min. The released exudate was measured (in quadruplicate) and expressed as % initial sample weight to determine the gravitational stability of GDE-C and GDE-Hyt.

Heating losses were measured (in quadruplicate) to determine the thermal stability (water and fat binding properties) of these systems as described elsewhere (Jiménez-Colmenero, Carballo, & Solas, 1995). Briefly, the sealed tubes containing both GDEs were heated in a water bath (30 min at 70 °C). They were then opened and left to stand upside down for 50 min to release the exudate (fat and water) onto a previously-weighed plate. Total loss (cooking loss) was expressed as % of initial sample weight.

2.7. Lipid oxidation

Lipid hydroperoxides (primary oxidation) were measured (in triplicate) according to Salcedo-Sandoval et al. (2015) with the following modifications. Determination was carried out on 1 g of sample using 15 mL of chloroform/methanol (1:1, v/v) as extraction solvent. Hydroperoxide concentration (mmol hydroperoxides/kg sample) was determined after measuring the absorbance (after reacting with ammonium thiocyanate and ferrous iron solution) at 510 nm (Shimadzu UV-1800 spectrophotometer, Shimadzu Inc., Kyoto, Japan), on a standard curve of cumene hydroperoxide (0–20 µM).

TBARS values (secondary oxidation) were measured (in triplicate) following the method described by Serrano, Cofrades, and Jiménez-Colmenero (2006). Briefly, 4 g of each sample was homogenized for 1 min with 23 mL of 7.5% trichloroacetic acid (Panreac Química, S.A. Barcelona, Spain) plus 0.1% EDTA (Sigma-Aldrich Madrid, Spain) at high speed in an Omnimixer blender (Sorval, Waterbury, USA) immersed in an ice-water bath. 13 mL n-hexane (Panreac Química, S.A. Barcelona, Spain) containing 0.8% butylated hydroxytoluene (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) was added to this solution and mixed. The sample was centrifuged at 3000g (Heraeus™ Multifuge 3 LR, DJB Lab-care Ltd.; Buckinghamshire, UK) for 30 min and 5 mL of the supernatant was mixed with 5 mL of 20 mM thiobarbituric acid (Merck KGaA, Madrid, Spain). This solution was kept in the dark at 20 °C for 20 h and the colour was measured spectrophotometrically (Shimadzu Inc., Kyoto, Japan) at 532 nm. A calibration curve was plotted using 1,1,3,3-tetraethoxypropane (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) as the malondialdehyde (MDA) source, and results were expressed as mg MDA/kg of sample.

2.8. Antioxidant capacity

A sensitive chemiluminescence-detection reaction was used to determine (in triplicate) antioxidant activity in GDEs using an automated photochemiluminescent system (Photochem®, Analytik Jena Model AG; Analytik Jena USA, The Woodlands, TX, USA), as described by Cofrades et al. (2011). Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) was used as a standard. The results were expressed in Trolox Equivalents (mmol TE/g

sample).

2.9. Microbiology

Ten g of sample (in replicate) were taken (in a vertical laminar-flow cabinet, Telstar model AV 30/70, Madrid, Spain) and placed in a sterile plastic bag (Sterilin, Stone, Staffordshire, UK) with 90 mL peptone water (Panreac Química S.A., Barcelona, Spain). After 1 min in a stomacher blender (Colworth 400, Seward, London, UK), appropriate decimal dilutions were pour-plated on the following media: Plate Count Agar (PCA) (Merck, Germany) for total viable counts (TVC, 30 °C for 72 h). The results were expressed as logarithms of colony forming units per gram (log cfu/g).

2.10. Statistical analysis

The repeated measures test was used for statistical comparisons between samples. The effects of formulation, storage time and their interaction on GDE characteristics were analysed using a MANOVA. In addition, series of one-way ANOVAs were performed for each storage time to determine any significant differences between samples. A $P < 0.05$ was considered significant, and Tukey's HSD test was used to identify significant differences between least-squares means. Statistical analysis was carried out using IBM SPSS statistics 22 software (IBM SPSS Inc., Chicago, IL).

3. Results and discussion

The experimental conditions were based on the formation of non-thermally-reversible hydrogels by gelling the continuous phase with a combination of gelatin/MTG originated that GDE-C and GDE-Hyt presented a solid-like structure at room temperature, but while GDE/Hyt contained 30 g of perilla oil (lipid phase) and 10 mg/100 g of the Hyt (in the inner aqueous phase), a similar control sample (GDE/C) was prepared without Hyt. This new food-grade material possesses advantages such as improved fat content (high levels of n-3 PUFA from perilla oil) without the limitations associated with the use of liquid vegetable oils, and the simultaneous incorporation of Hyt, which has been found to be a suitable strategy to efficiently protect n-3 fatty acid-enriched double emulsions from oxidation (Cofrades et al., 2014), even at the expense of some Hyt loss, mainly during preparation and chilling storage of GDEs (Flaiz et al., 2016). Despite the fact that these systems seemed to be relatively stable towards oxidation, it is not completely clear if the physicochemical, oxidative or microbiological stability of these systems during their cold storage may limit their applicability.

3.1. Droplet characteristics of DEs

The incorporation of Hyt in the inner aqueous phase of a gelled double emulsion affected the structural and physicochemical properties of these new systems in different ways. Both DEs presented a well-defined monomodal distribution as described by Flaiz et al. (2016): the sample with Hyt registered a wider particle size range (0.58–9 µm for DE-C versus 0.47–18 µm for DE-Hyt) (Fig. 1) and a higher ($P < 0.05$) mean droplet size ($d_{4,3}$: 2.55 ± 0.12 µm for DE-C and 3.72 ± 0.33 µm for DE-Hyt) than the control sample (DE-C). Volume average diameters ($d_{4,3}$) were in line with those found for similar DEs (Flaiz et al., 2016), with values of 2.0–2.5 µm, and with DEs prepared with a chia oil lipid phase (Cofrades et al., 2014), which registered values close to 3.0 µm. These values were lower than those reported by Patel et al. (2015) for other types of GDE (ranging from 20 to 40 µm), which were prepared under less comparable conditions.

Monomodal distributions have been reported in DEs containing PGPR and SC as lipophilic and hydrophilic emulsifiers respectively (Bou, Cofrades, & Jiménez-Colmenero, 2014; Cofrades, Antoniou, Solas, Herrero, & Jiménez-Colmenero, 2013). However, in a previous study

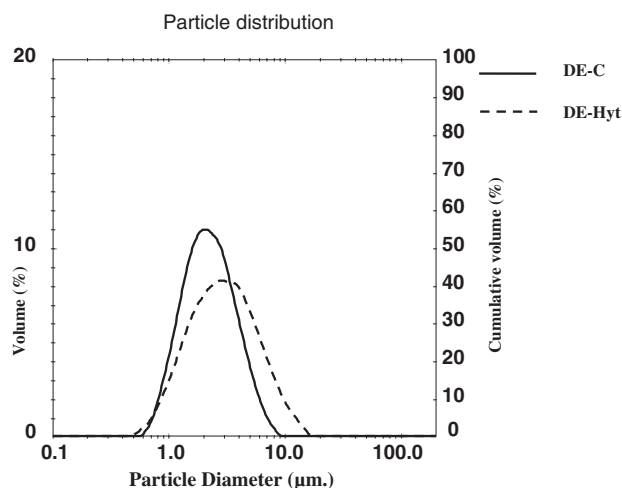


Fig. 1. Particle size distribution of double emulsions with and without hydroxytyrosol (DE-C and DE-Hyt) measured one day after preparation.

the addition of Hyt in the inner aqueous phase in this type of DEs but differing in the presence of chia oil in the lipid phase (and non-gelled), the particle size distribution tended to be bimodal (Cofrades et al., 2014). In line with these findings, our results indicated that the presence of Hyt in the inner aqueous phase affected droplet size distribution.

3.2. Rheological and textural properties

The rheological properties of GDEs were affected by their composition; this could influence attributes of the reformulated products and they may therefore prove useful tools for different food applications (including meat products). In the frequency sweep, the behaviour of fresh GDEs (without and with Hyt) was predominantly more elastic than viscous, with G' much greater than G'' throughout the frequency range studied (Fig. 2). Both fresh samples displayed practically no dependence on frequency for G' while G'' presented some slight dependence on frequency, mainly at low frequencies (Fig. 2). It is well known that increasing the structural strength of such systems reduces the influence of frequency, so that the gel structure is consolidated, as can be seen in the studied samples (Fig. 2). The phase angle (δ), which is represented by the ratio of G'' and G' , gives a relative measure of associated energy loss vs energy stored in a cyclic deformation. In this

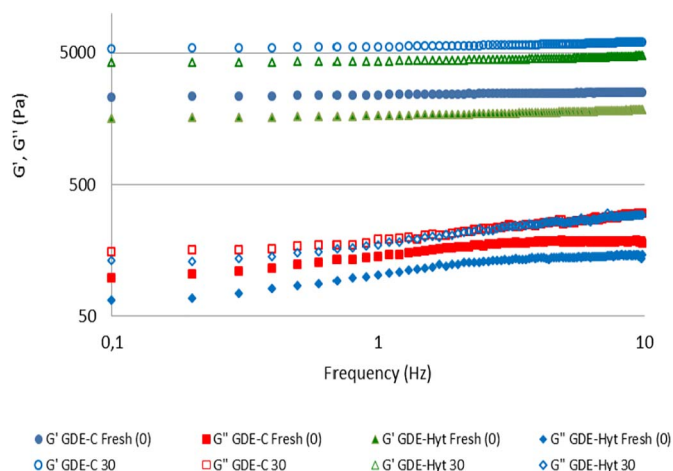


Fig. 2. Variation of the storage modulus (G') and loss modulus (G'') as a function of the frequency (Hz) as determined in the frequency sweep tests (at 25 °C) for DEG-C and DEG-Hyt at the beginning (Fresh, 0) and after 30 days chilling storage.

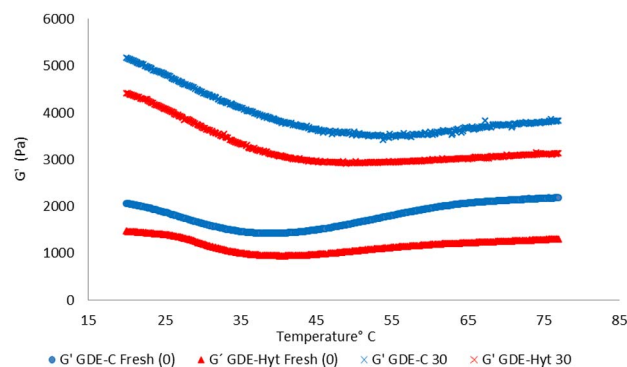


Fig. 3. Dynamic storage (G') moduli for DEG-C and DEG-Hyt at the beginning (Fresh, 0) and after 30 days chilling storage as determined in the temperature sweep test.

study, (δ) values of fresh GDEs were low ($\delta \leq 4$) (data not shown). Assuming that a phase angle of 90° represents a fully viscous material, while a fully elastic material is characterized by a zero, our results indicated gels with a strong structure. However, the presence of Hyt in the inner aqueous phase of the GDEs caused a slight decrease in the elastic and viscous moduli (Fig. 2), thus suggesting the formation of weaker gels as a consequence of the addition of Hyt.

To secure more information on gel structure, a temperature sweep was carried out. The behaviour of these GDEs during heating was evaluated by monitoring the elastic modulus (G'), viscous modulus (G'') and phase angle (δ) during heating from 20 to 80 °C (Figs. 3 and 4). G' and G'' showed similar trends in both GDEs, but G'' values were slight in comparison to G' , suggesting predominantly elastic behaviour (therefore, only G' values are discussed). G' in freshly prepared GDEs presented similar patterns although G' values of GDE-Hyt were lower throughout the temperature range studied. There was a slight decrease in G' , which could be attributed to the melting of bovine gelatin, which depends on gelatin grade and concentration (but is typically < 35 °C) (Haug, Dragnet, & Smidsrød, 2004). Part of this content was probably not involved in the formation of the thermostable gel produced by enzymatic cross-linking. From 40 °C upwards, G' increased to values close to those found at low temperatures. Such behaviour indicates high stability in this system, which is attributable to the formation of thermostable gels. Nevertheless, the relatively lower G' values in GDE-Hyt (Fig. 3) are consistent with the frequency sweep results (Fig. 2), thus again suggesting that the presence of Hyt contributes to the formation of weaker gels. On the other hand, the low δ values (Fig. 4) for both samples over heating indicated good elasticity in these GDEs (Fig. 4). The decrease of δ with increasing temperature indicates the formation of stronger gels (Fig. 4).

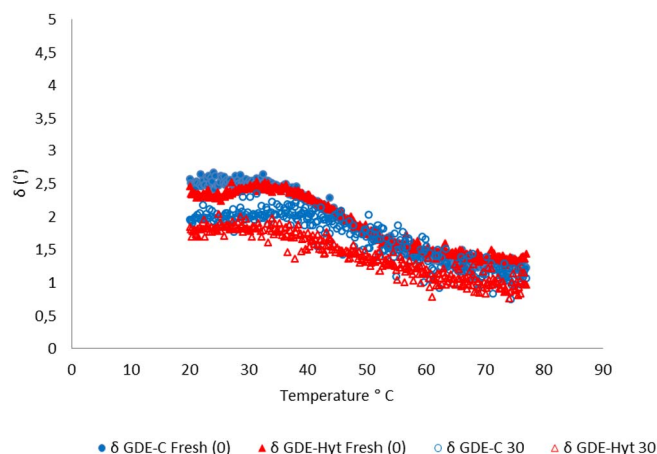


Fig. 4. Phase angle (δ) for DEG-C and DEG-Hyt at the beginning (Fresh, 0) and after 30 days chilling storage as determined in the temperature sweep test.

Table 1

TPA parameters of the gelled double emulsions as affected by chilling storage.

		Chilling storage (days at 2 °C)			
		0 (freshly prepared)	8	15	30
Hardness (N)	GDE-C	14.06 ± 0.28 ^{a,2}	23.67 ± 0.43 ^{b,2}	26.96 ± 0.39 ^{c,1}	28.60 ± 0.35 ^{d,2}
	GDE-Hyt	11.90 ± 0.22 ^{a,1}	19.79 ± 0.44 ^{b,1}	26.45 ± 0.85 ^{c,1}	25.61 ± 0.59 ^{d,1}
Cohesiveness (dimensionless)	GDE-C	0.94 ± 0.00 ^{a,1}	0.94 ± 0.00 ^{a,1}	0.95 ± 0.00 ^{b,2}	0.95 ± 0.00 ^{b,2}
	GDE-Hyt	0.95 ± 0.00 ^{b,2}	0.94 ± 0.00 ^{a,1}	0.94 ± 0.00 ^{a,1}	0.94 ± 0.00 ^{a,1}
Springiness (mm)	GDE-C	9.56 ± 0.08 ^{a,1}	9.60 ± 0.04 ^{a,2}	9.67 ± 0.02 ^{a,2}	9.66 ± 0.07 ^{a,1}
	GDE-Hyt	9.64 ± 0.04 ^{a,1}	9.58 ± 0.08 ^{a,1}	9.58 ± 0.05 ^{a,1}	9.60 ± 0.05 ^{a,1}
Chewiness (Nmm)	GDE-C	129.21 ± 3.18 ^{a,2}	214.35 ± 2.65 ^{b,2}	248.41 ± 2.72 ^{c,1}	257.85 ± 5.92 ^{d,2}
	GDE-Hyt	109.57 ± 1.55 ^{a,1}	178.12 ± 3.27 ^{b,1}	239.89 ± 9.94 ^{c,1}	232.84 ± 3.35 ^{c,1}

DEG-C, gelled double emulsions without Hyt (control sample); DEG-Hyt, gelled double emulsion with Hyt (100 mg/kg). Mean ± SD. Different letters in the same row or numbers in the same column indicate significant differences ($P < 0.05$).

The textural properties of these systems provide useful information about their nature, and also about their potential influence on the characteristics of products in which they can be added. In freshly prepared GDEs, TPA parameters were affected by the presence of Hyt. This induced a decrease ($P < 0.05$) of hardness and chewiness (Table 1), which is in line with the reported decrease in rheological parameters upon addition of Hyt (Figs. 2 and 3). The rheological and mechanical properties of these materials are expected to be determined basically by their primary structural elements, the properties and volume fraction of the emulsion, and the characteristics of the gel structures formed. In this regard, the greater droplet size and broader size distribution recorded in the emulsion with Hyt (Fig. 1) could explain why structures were less viscous and rigid given the diminished probability of particle-particle interactions (Bou et al., 2014; McClements, Monahan, & Kinsella, 1993). However, this may not entirely explain the differences in the rheological and mechanical properties of the freshly prepared samples given the limited possibilities of further droplet changes after gelling (DE droplets immobilized in the MTG/gelatin gel structure). Considering that the GDE's lipid volume fraction was relatively low and similar in all samples, those differences in the characteristics of the systems can be attributed mainly to the gelled aqueous phase and the interaction between the gelled matrix and DE droplets (Dickinson, 2012). In this case, given the nature of these emulsions and the experimental conditions, the gelling of the aqueous phase may be attributed to the combination of two phenomena, one the gelation of gelatin, which is thermally reversible, and the second the formation of a thermostable gel due to the addition of MTG, which contributes to structural diversity. In this system, Flaiz et al. (2016) reported that combinations of MTG form a continuous covalently linked phase in which oil droplets are closely packed. Additionally, the presence of caseinate as a hydrophilic emulsifier suggests that DEs could serve as active fillers, as caseinate is known to interact with MTG, helping to stabilize GDEs; additionally, bovine gelatin can produce crosslinked gels with MTG. In this case some structural changes were induced.

Lipid change disorder or lipid-protein interaction and protein secondary modifications contribute to the formation of gel structure in the emulsion (Herrero, Carmona, Pintado, Jiménez-Colmenero, & Ruiz-Capillas, 2011) and include the possibility of forming protein-coated oil droplets (Yang, Liu, & Tang, 2013). In these circumstances the presence of Hyt may counteract such processes and thus affect their solid-like rheological and mechanical properties. Hyt is reported to have a weak affinity for typical food proteins including caseinate and gelatin (Pripp, Vreeker, & van Duynhoven, 2005); however, phenolic compounds are known to interact strongly with proteins, which suggests that their capacity to influence the formation of stabilized structures through hydrogen bonding could be limited. It is reasonable to suppose that the presence of Hyt, even in small amounts, may interfere slightly with molecular interactions (covalent protein cross-linking) during the cold-gelling process, inducing a less rigid protein gel structure in the outer aqueous continuous phase (Table 1, Figs. 2 and 3). It is important to note

that Hyt is initially localized in the inner aqueous phase of the GDE; however, part of this content is present in the outer aqueous phase, as evidenced by the fact that Hyt encapsulation efficiency in this type of DE was 55% (Flaiz et al., 2016). Similar transfer phenomena have been reported in other types of GDEs, for instance the release of tryptophan encapsulated in the inner aqueous phase of W/O/W emulsions embedded in alginate gels (Weiss, Scherze, & Muscholik, 2005).

GDEs, like many other perishable ingredients used in meat product formulation, need to be stored in different conditions (e.g. chilling) according to production and market requirements. Hence, it is important to study the effect of chilling storage on GDE characteristics as this may help to establish conditions of use and improve the quality of the products. The solid-like structure of GDEs remained unchanged (i.e. no syneresis) over storage. During storage, hardness and chewiness parameters of GDEs increased ($P < 0.05$). The progressive increase was more pronounced during the first days of storage and was greater in the presence of Hyt (Table 1). As compared with hardness and chewiness, only minor changes were observed in springiness and cohesiveness over chilling storage. The rheological behaviour of these systems was consistent with those textural changes, so that G' and G'' were greater after 30 days of storage in both the frequency and temperature sweeps (Figs. 2 and 3). The decrease of the phase angle, which was smaller at the end of storage (Fig. 4), indicated that good gel characteristics were maintained during chilling storage, and also that there was some structural strengthening of GDEs, which is consistent with the results for hardness (Table 1) and G' (Fig. 2). In this regard, Pintado, Ruiz-Capillas, Jiménez-Colmenero, Carmona, and Herrero (2015) reported an increase in the gel strength of oil-in-water emulsion gels formulated with olive oil, chia and cold gelling agent (including MTG and gelatin) during chilled storage. This phenomenon seems to be unrelated to changes in lipid chain disorder or lipid interactions of gel emulsions (O/W) (Pintado et al., 2015), and hence this structural reinforcement may be attributable to changes in the nature of the protein gel network. Such changes could be related to increased protein-protein interactions during storage due to some residual MTG activity (Cofrades, Ayo, Serrano, Carballo, & Jiménez-Colmenero, 2006). However, the reinforcement in gelled emulsions with changes in the structural organization of the fat droplets has recently been associated with their effect on the structural characteristics of the gel matrix (Oliver, Wieck, & Scholten, 2016). In this regard, Flaiz et al. (2016) reported movement of inner water droplets inside the lipid phase of these GDEs.

3.3. Gravitational and thermal stability

Most meat products are subjected to some kind of heating process (i.e. production practices or domestic preparation), so the ability to retain water and fat binding properties of any new ingredient such as GDE needs to be considered. Irrespective of formulation, freshly prepared GDEs had excellent water and fat binding properties since no losses were observed in either system before (gravitational stability) or

Table 2

Effect of chilling storage on pH, gravitational and cooking losses of gelled double emulsions.

		Chilling storage (days at 2 °C)			
		0 (freshly prepared)	8	15	30
pH	GDE-C	7.50 ± 0.02 ^{c,1}	7.49 ± 0.01 ^{c-d,2}	7.48 ± 0.01 ^{c,2}	7.17 ± 0.00 ^{a,1}
	GDE-Hyt	7.41 ± 0.17 ^{a-b,1}	7.47 ± 0.01 ^{c,1}	7.40 ± 0.01 ^{a,1}	7.41 ± 0.01 ^{a-b,2}
Gravitational loss (%)	GDE-C	0.00 ± 0.00 ^{a,1}	0.00 ± 0.00 ^{a,1}	3.60 ± 0.17 ^{b,2}	5.80 ± 0.21 ^{c,2}
	GDE-Hyt	0.00 ± 0.00 ^{a,1}	0.00 ± 0.00 ^{a,1}	0.96 ± 0.24 ^{b,1}	2.53 ± 0.47 ^{c,1}
Cooking loss (%)	GDE-C	0.00 ± 0.00 ^{a,2}	2.82 ± 0.10 ^{c,2}	2.10 ± 0.07 ^{b,2}	2.10 ± 0.07 ^{b,2}
	GDE-Hyt	0.00 ± 0.01 ^{a,1}	1.18 ± 0.42 ^{b,1}	1.39 ± 0.01 ^{b-c,1}	1.60 ± 0.14 ^{c,1}

DEG-C, gelled double emulsion without Hyt (control sample); DEG-Hyt, gelled double emulsion with Hyt (100 mg/kg). Mean ± SD. Different letters in the same row or numbers in the same column (indicate significant differences ($P < 0.05$)).

after heating (Table 2), especially considering that they contain very high proportions of water and fat (around 93%). Therefore, the reported changes in the structural building of the continuous aqueous phase due to the presence of Hyt had no effect on these parameters. This fact argues in favour of the use of both types of GDEs for meat product reformulation since processing and cooking losses are limited. This has been confirmed in pork patties reformulated by partial and total replacement of pork backfat with GDEs (Freire et al., submitted).

There was no gravitational loss up to 15 days of storage in either GDE, but this increased progressively thereafter, particularly in the case of GDE-C (Table 2). In fact GDE-Hyt presented no significant loss levels (over 1%) until 30 days, which is consistent with the absence of gravitational loss in this GDE after 22 days of storage as reported by Flaiz et al. (2016). Cooking loss of GDEs increased ($P < 0.05$) after 8 days of storage (Table 2). As for GDE-C, no further changes were observed over the course of storage, whereas in GDE-Hyt cooking losses increased progressively with storage. The initial behaviour and the relatively low gravitational and cooking losses, even over longer storage periods, indicate good water and fat binding properties in the structural organization of these new animal fat replacers. In fact, the high chilling stability observed in the rheological properties (Figs. 2, 3, and 4) could be related to the excellent binding properties (gravitational and cooking loss) observed over the storage period (Table 2). That being so, better water binding properties may be associated with greater structural strength.

3.4. Colour and pH

After preparation, the studied GDEs had a similar whitish solid-like appearance at room temperature resembling that of pork lard. Despite that, GDE colour parameters were affected by the formulation (Table 3). The presence of Hyt reduced ($P < 0.05$) lightness and yellowness whereas redness increased ($P < 0.05$). This effect seems to be related to the migration of Hyt from the inner aqueous phase to the outer aqueous phase as reported earlier. Colour parameters of GDE-Hyt were similar to those reported by Flaiz et al. (2016).

Colour parameters were affected by storage (Table 3). However,

minor changes were observed in lightness during storage in both samples. In GDE-C, redness values were similar at the beginning and at the end of storage, whereas in the case of GDE-Hyt these values decreased after 8 days ($P < 0.05$), remaining unchanged thereafter. Yellowness increased ($P < 0.05$) during chilling storage, particularly in the case of GDE-Hyt. Overall, such changes have minimal impact and therefore do not jeopardize the use of these fat analogues.

The pH of fresh GDEs was not affected by formulation (Table 2). During storage the pH values of GDEs ranged between 7.4–7.5 and thus were barely affected by storage despite the fact that the pH of GDE-C decreased to 7.17 (Table 2). For purposes of using these systems as animal fat replacers in foods such as meat products, it is important to consider pH values, which are higher than those observed in pork fat (6.7) (Jiménez-Colmenero et al., 2012).

3.5. Lipid oxidation

Given that these GDEs were designed as n-3 PUFA delivery systems, the evaluation of their oxidative stability is important. At the initial time, all GDE samples presented similar lipid hydroperoxide and TBARS values (Table 4). Overall, results indicate the existence of incipient oxidative processes which can be attributed mainly to the processing conditions in the preparation of GDEs and the high susceptibility of n-3 fatty acids from perilla oil to oxidation. These results are in agreement with the study by Flaiz et al. (2016) which compared various emulsion-based delivery systems with structural differences (simple emulsion, double emulsion and gelled double emulsion) containing Hyt. The addition of Hyt had no apparent influence on GDE-Hyt oxidation status but it did have a clear effect on antioxidant capacity, which was 12 times higher than the control sample (Table 4). These results are in line with those of Cofrades et al. (2011), who reported that the addition of Hyt in the inner aqueous phase of DE produced increased antioxidant capacity. These results are explained by the excellent capacity of Hyt to act as a free radical scavenger through H atom donation (Leopoldini, Russo, & Toscano, 2011).

Irrespective of the composition, the changes in lipid hydroperoxide and TBARS contents over storage of GDEs were relatively small if

Table 3

Colour parameters of gelled double emulsions as affected by chilling storage.

		Chilling storage (days at 2 °C)			
		0 (freshly prepared)	8	15	30
Lightness, L*	GDE-C	94.72 ± 0.15 ^{b,2}	94.56 ± 0.19 ^{a-b,2}	94.30 ± 0.36 ^{a,2}	94.34 ± 0.12 ^{a,2}
	GDE-Hyt	92.04 ± 0.27 ^{b,1}	91.98 ± 0.23 ^{b,1}	91.33 ± 0.45 ^{a,1}	91.17 ± 0.37 ^{a,1}
Redness, a*	GDE-C	−1.26 ± 0.02 ^{a,1}	−1.07 ± 0.26 ^{b,1}	−1.22 ± 0.03 ^{a-b,1}	−1.29 ± 0.02 ^{a,1}
	GDE-Hyt	1.33 ± 0.23 ^{b,2}	0.82 ± 0.15 ^{a,2}	0.88 ± 0.23 ^{a,2}	0.68 ± 0.07 ^{a,2}
Yellowness, b*	GDE-C	7.52 ± 0.10 ^{a,2}	7.80 ± 0.13 ^{b,2}	7.83 ± 0.18 ^{b,1}	8.14 ± 0.10 ^{c,1}
	GDE-Hyt	6.92 ± 0.11 ^{a,1}	7.42 ± 0.11 ^{b,1}	7.93 ± 0.39 ^{c,1}	8.27 ± 0.26 ^{d,1}

DEG-C, gelled double emulsion without Hyt (control sample); DEG-Hyt, gelled double emulsion with Hyt (100 mg/kg). Mean ± SD. Different letters in the same row or numbers in the same columns indicate significant differences ($P < 0.05$).

Table 4

Lipid oxidation stability (lipid hydroperoxides LH and TBARS) and antioxidant capacity (PCL) of gelled double emulsion during chilling storage.

		Chilling storage (days at 2 °C)			
		0 (freshly prepared)	8	15	30
LH (mmol/kg)	GDE-C	1.09 ± 0.04 ^{a,1}	1.15 ± 0.03 ^{a,2}	1.35 ± 0.06 ^{b,1}	1.32 ± 0.04 ^{b,2}
	GDE-Hyt	1.06 ± 0.01 ^{a,1}	1.00 ± 0.02 ^{a,1}	1.23 ± 0.09 ^{b,1}	0.97 ± 0.04 ^{a,1}
TBARS (mg MDA/kg)	GDE-C	0.73 ± 0.11 ^{c,1}	0.52 ± 0.1 ^{b,1}	0.55 ± 0.07 ^{b,1}	0.76 ± 0.03 ^{c,2}
	GDE-Hyt	0.79 ± 0.07 ^{d,1}	0.68 ± 0.05 ^{c,2}	0.66 ± 0.03 ^{c,2}	0.33 ± 0.02 ^{b,1}
PCL (mg TROLOX/kg)	GDE-C	0.18 ± 0.01 ^{a,1}	0.17 ± 0.00 ^{a,1}	0.18 ± 0.01 ^{a,1}	0.19 ± 0.01 ^{a,1}
	GDE-Hyt	2.17 ± 0.04 ^{c,2}	1.95 ± 0.08 ^{b,2}	1.89 ± 0.09 ^{b,2}	1.48 ± 0.00 ^{a,2}

DEG-C, gelled double emulsion without Hyt (control sample); DEG-Hyt, gelled double emulsion with Hyt (100 mg/kg). Mean ± SD. Different letters in the same row or numbers in the same columns indicate significant differences (P < 0.05).

significant (Table 4). Therefore, these systems can be considered little prone to oxidation even at 30 days, as reported previously by Flaiz et al. (2016). The antioxidant activity of Hyt can be observed by comparing those changes in lipid hydroperoxide contents between samples (GDE-C versus GDE-Hyt) (Table 4). The photochemiluminescence of GDE-C remained unchanged (P > 0.05) over storage and was much lower than GDE-Hyt in all periods (P < 0.05). The antioxidant capacity of this system decreased with storage (Table 4); this result is in agreement with the reported Hyt loss during storage (Flaiz et al., 2016) and indicates a reduction of the system's ability to scavenge radicals even when lipid oxidation did not clearly progress. Given that both samples presented similar behaviour in terms of oxidation (Table 4), the stability of GDE-Hyt seems not to be directly associated with the activity of Hyt, which decreases with chilling storage (Flaiz et al., 2016). The oxidative stability of this type of system depends not only on factors associated with the antioxidant but also on its localization (in the oil-water interphase), release into the lipid phase, and other aspects relating to the nature of the systems (Cofrades et al., 2014). Given that the structural characteristics of DEs (compartmentalized systems) favour susceptibility to lipid oxidation (Flaiz et al., 2016), the observed stability may be related to the presence of other components such as the emulsifier and/or gelling agents in these GDEs. In this regard, gelatin has been reported to reduce lipid oxidation in gelled emulsions (Sato, Moraes, & Cunha, 2014). This effect was attributed to the ability of gelatin to adsorb on the oil/water interface, thus acting as a barrier and limiting interaction between lipids and prooxidants (McClements & Decker, 2000). Similarly, caseinate (hydrophilic emulsifier), which is present (in both GDEs) in the two interfaces of the (W/O)/W as well as in the outer aqueous phase, inhibits lipid oxidation, scavenging lipid oxidation products and chelating transition metals (Dwyer, Beirne, Eidhin, & Kennedy, 2012; Matalanis, Decker, & McClements, 2012). The antioxidant effect of Hyt has been reported in different matrixes (Cofrades et al., 2011; Pazos et al., 2008) including double emulsions (Cofrades et al., 2014; Flaiz et al., 2016), but its effect depends on several factors (concentration, incorporation strategy, etc.).

3.6. Microbiology

Microbiological aspects need to be considered for better application of this food ingredient in healthier-lipid food reformulation processes. The microbial counts of these GDEs were relatively low at the initial time and thus consistent with good manufacturing practices. The addition of Hyt caused the reduction of TVC by almost 1 log (Table 5). The antimicrobial activity of Hyt, has been demonstrated in various model systems (Bisignano et al., 1999; Medina-Martínez et al., 2016) in which the inhibition of microbial growth as a consequence of Hyt may depend on several factors such as nutrient-richness of culture media, type of strains and concentration of Hyt (Medina-Martínez et al., 2016). To the best of our knowledge, this is the first time that the antimicrobial activity of Hyt has been reported in structured emulsions.

Table 5

Microbial count (log CFU/g) changes of gelled double emulsions during chilling storage.

	Chilling storage (days at 2 °C)	Total viable count (TVC)	Lactic acid bacteria (LAB)	Yeast-mould
GDE-C	0	2.18 ± 0.11 ^{1,b}	1.00 ± 0.00 ^{1,a}	2.00 ± 0.00 ^{1,a}
	8	3.21 ± 0.92 ^{2,b}	1.00 ± 0.00 ^{1,a}	2.00 ± 0.00 ^{1,a}
	15	6.73 ± 0.00 ^{3,b}	1.30 ± 0.42 ^{2,a}	2.00 ± 0.00 ^{1,a}
	30	8.19 ± 0.60 ^{4,a}	2.08 ± 0.00 ^{3,a}	2.00 ± 0.42 ^{1,a}
GDE-Hyt	0	1.60 ± 0.00 ^{1,a}	1.00 ± 0.00 ^{1,a}	2.30 ± 0.00 ^{1,b}
	8	1.60 ± 0.00 ^{1,a}	1.00 ± 0.00 ^{1,a}	2.00 ± 0.00 ^{2,a}
	15	5.30 ± 0.00 ^{2,a}	2.43 ± 0.00 ^{2,b}	2.85 ± 0.00 ^{3,b}
	30	7.52 ± 0.37 ^{3,a}	4.37 ± 0.04 ^{3,b}	4.69 ± 0.13 ^{4,b}

DEG-C, gelled double emulsion without Hyt (control sample); DEG-Hyt, gelled double emulsion with Hyt (100 mg/kg). Mean ± SD. Different letters (between samples for each storage period) and number (between different storage time for each sample) in the same column indicate significant differences (P < 0.05).

Total viable counts of both GDEs increased (P < 0.05) during storage (Table 5). This microbial growth was delayed and less pronounced in the presence of Hyt (GDE-Hyt), although the TVC (around 8 log cfu/g) was comparable at the end of the storage. This behaviour suggests that Hyt possesses some antimicrobial activity, which is mainly observed during the first weeks of storage. This storage period can be used to set the limit time for the addition of this ingredient into the food matrix. Among other consequences, bacterial growth may cause a reduction of Hyt concentration (Medina-Martínez et al., 2016).

4. Conclusions

The formation of cold-set gelled double emulsions using MTG and gelatin for delivery of n-3 fatty acids and Hyt produces whitish solid-like structures at room temperature that are suitable for use as animal fat replacers. This opens up new possibilities for the use of vegetable and marine oils in healthy food reformulation processes without many of the limitations associated with their liquid form and their susceptibility to lipid oxidation. There are various noteworthy aspects related to the physicochemical characteristics and stability to chilling storage of this new food-grade material. Overall, these GDEs presented the kind of essentially elastic behaviour characteristic of the desired type of gel, whose structure is reinforced in the course of storage. The added Hyt, initially localized in the inner aqueous phase, is distributed in the different structural elements of the GDE and seems to interfere in the gelling processes, thus limiting the formation of substantial structures. The presence of Hyt enhances the system's antioxidant capacity (initially up to 12-fold), although this declines with storage. Then again, in the experimental conditions the presence of emulsifiers and/or gelling agents such as caseinate or gelatin seemed to affect the oxidative stability of the GDEs. Although Hyt exhibited some antimicrobial activity, mainly within the two first weeks of storage, microbial growth in GDEs seems to be the limiting factor when establishing the useful life of this

kind of ingredients in a food matrix.

Acknowledgments

The authors wish to thank the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness for Ms. María Freire's predoctoral fellowship BES-2012-057977. Dr. R. Bou has been supported by a contract from the JAE-postdoctoral (CSIC) Program financed in part through the European Social Fund (ESF). This work was supported under Projects AGL 2014-53207-C2-1-R, Comunidad de Madrid under Project MEDGAN-CMS2013/ABI2913, and CSIC under Projects 201470E056 and 201470E073. The authors wish to thank C. de la Mata for her technical support.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2017.08.047>.

References

- Benna-Zayani, M., Kbir-Ariguib, N., Trabelsi-Ayadi, M., & Grossiord, J. L. (2008). Stabilisation of W/O/W double emulsion by polysaccharides as weak gels. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 316(1–3), 46–54. <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2007.08.019>.
- Bisignano, G., Tomaino, A., Lo Cascio, R., Crisafi, G., Uccella, N., & Saija, A. (1999). On the in-vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 51(8), 971–974. <http://dx.doi.org/10.1211/0022357991773258>.
- Bou, R., Cofrades, S., & Jiménez-Colmenero, F. (2014). Physicochemical properties and riboflavin encapsulation in double emulsions with different lipid sources. [article]. *LWT - Food Science and Technology*, 59(2), 621–628. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2014.06.044>.
- Bourne, M. C. (1978). Texture profile analysis. *Food Technology*, 32(7).
- Canet, W., Fernández, C., & Alvarez, M. D. (2009). Some objective instrumental methods for evaluating the texture of solid potato tissue (*Solanum tuberosum* L.) (Special issue 1). *Food*, 3, 1–12.
- Cofrades, S., Antoniou, I., Solas, M. T., Herrero, A. M., & Jiménez-Colmenero, F. (2013). Preparation and impact of multiple (water-in-oil-in-water) emulsions in meat systems. *Food Chemistry*, 141(1), 338–346. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.02.097>.
- Cofrades, S., Ayo, J., Serrano, A., Carballo, J., & Jiménez-Colmenero, F. (2006). Walnut, microbial transglutaminase and chilling storage time effects on salt-free beef batter characteristics. *European Food Research and Technology*, 222(3–4), 458–466. <http://dx.doi.org/10.1007/s00217-005-0017-y>.
- Cofrades, S., Bou, R., Flaiz, L., Garcimartín, A., Benedí, J., Mateos, R., & Jiménez-Colmenero, F. (2017). Bioaccessibility of hydroxytyrosol and n-3 fatty acids as affected by the delivery system: Simple, double and gelled double emulsions. *Journal of Food Science and Technology*. <http://dx.doi.org/10.1007/s13197-017-2604-x>.
- Cofrades, S., López-López, L., & Jiménez-Colmenero, F. (2011). Applications of seaweed in meat-based functional foods. *Handbook of Marine Macroalgae: Biotechnology and Applied Phycology* (pp. 491). .
- Cofrades, S., Salcedo-Sandoval, L. S., Delgado-Pando, G., López-López, L., Ruiz-Capillas, C., & Jiménez-Colmenero, F. (2011). Antioxidant activity of hydroxytyrosol in frankfurters enriched with n-3 polyunsaturated fatty acids. *Food Chemistry*, 129(2), 429–436. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.04.095>.
- Cofrades, S., Santos-López, J. A., Freire, M., Benedí, J., Sánchez-Muniz, F. J., & Jiménez-Colmenero, E. (2014). Oxidative stability of meat systems made with W-1/O/W-2 emulsions prepared with hydroxytyrosol and chia oil as lipid phase. *LWT - Food Science and Technology*, 59(2), 941–947. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2014.06.051>.
- Delampla, M., Da Silva, F., & Leal-Calderon, F. (2014). Osmotically driven gelation in double emulsions. *Food Hydrocolloids*, 38, 11–19. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.11.009>.
- Dickinson, E. (2011). Double emulsions stabilized by food biopolymers. *Food Biophysics*, 6(1), 1–11. <http://dx.doi.org/10.1007/s11483-010-9188-6>.
- Dickinson, E. (2012). Emulsion gels: The structuring of soft solids with protein-stabilized oil droplets. *Food Hydrocolloids*, 28(1), 224–241. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.12.017>.
- Dwyer, S. P. O., Beirne, D. O., Eidhin, D. N., & Kennedy, B. T. O. (2012). Effects of green tea extract and alpha-tocopherol on the lipid oxidation rate of omega-3 oils, incorporated into table spreads, prepared using multiple emulsion technology. *Journal of Food Science*, 77(12), N58–N65. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02980.x>.
- Flaiz, L., Freire, M., Cofrades, S., Mateos, R., Weiss, J., Jiménez-Colmenero, F., & Bou, R. (2016). Comparison of simple, double and gelled double emulsions as hydroxytyrosol and n-3 fatty acid delivery systems. *Food Chemistry*, 213, 49–57. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.06.005>.
- Freire, M., Bou, R., Cofrades, S., Solas, M. T., & Jiménez-Colmenero, F. (2016). Double emulsions to improve frankfurter lipid content: Impact of perilla oil and pork backfat. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96, 900–908. <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.7163>.
- Haug, I. J., Draget, K. I., & Smidsrød, O. (2004). Physical and rheological properties of fish gelatin compared to mammalian gelatin. *Food Hydrocolloids*, 18(2), 203–213. [http://dx.doi.org/10.1016/S0268-005X\(03\)00065-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0268-005X(03)00065-1).
- Herrero, A. M., Carmona, P., Pintado, T., Jiménez-Colmenero, F., & Ruiz-Capillas, C. (2011). Olive oil-in-water emulsions stabilized with caseinate: Elucidation of protein-lipid interactions by infrared spectroscopy. *Food Hydrocolloids*, 25(1), 12–18. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.04.014>.
- Jiménez-Colmenero, F., Carballo, J., & Solas, M. T. (1995). The effect of use of freeze-thawed pork on the properties of bologna sausages with two fat levels. *International Journal of Food Science and Technology*, 30(3), 335–345.
- Jiménez-Colmenero, F., Cofrades, S., Herrero, A., Fernández-Martin, F., Rodríguez, L., & Ruiz-Capillas, C. (2012). Konjac gel fat analogue for use in meat products: Comparison with pork fats. *Food Hydrocolloids*, 26, 63–72. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.04.007>.
- Jiménez-Colmenero, F., Salcedo-Sandoval, L., Bou, R., Cofrades, S., Herrero, A. M., & Ruiz-Capillas, C. (2015). Novel applications of oil-structuring methods as a strategy to improve the fat content of meat products. *Trends in Food Science & Technology*, 44(2), 177–188. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2015.04.011>.
- Jo, H., Kim, M., Lee, J., Kim, H., & Song, Y. O. (2013). Anti-atherogenic properties of emulsified perilla oil (EPO) in Apo E KO mice and plasma lipid lowering effects of rice porridge containing EPO in healthy young adults. *Food Science and Biotechnology*, 22(1), 79–85. <http://dx.doi.org/10.1007/s10068-013-0011-2>.
- Leopoldini, M., Russo, N., & Toscano, M. (2011). The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chemistry*, 125(2), 288–306. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.08.012>.
- Liu, Y., Yadav, M. P., Chau, H. K., Qiu, S., Zhang, H., & Yin, L. (2017). Peroxidase-mediated formation of corn fiber gum-bovine serumalbumin conjugates: Molecular and structural characterization. *Carbohydrate Polymers*, 166, 114–122.
- Mao, L. K., & Miao, S. (2015). Structuring food emulsions to improve nutrient delivery during digestion. *Food Engineering Reviews*, 7(4), 439–451. <http://dx.doi.org/10.1007/s12393-015-9108-0>.
- Matalanis, A., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2012). Inhibition of lipid oxidation by encapsulation of emulsion droplets within hydrogel microspheres. *Food Chemistry*, 132(2), 766–772. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.11.034>.
- McClements, D. J. (2012). Advances in fabrication of emulsions with enhanced functionality using structural design principles. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 17(5), 235–245. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cocis.2012.06.002>.
- McClements, D. J., & Decker, E. A. (2000). Lipid oxidation in oil-in-water emulsions: Impact of molecular environment on chemical reactions in heterogeneous food systems. *Journal of Food Science*, 65(8), 1270–1282. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.2000.tb10596.x>.
- McClements, D. J., Monahan, F. J., & Kinsella, J. E. (1993). Effect of emulsion droplets on the rheology of whey-protein isolate gels. *Journal of Texture Studies*, 24(4), 411–422. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1745-4603.1993.tb00051.x>.
- Medina-Martínez, M. S., Truchado, P., Castro-Ibanez, I., & Allende, A. (2016). Antimicrobial activity of hydroxytyrosol: A current controversy. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 80(4), 801–810. <http://dx.doi.org/10.1080/09168451.2015.1116924>.
- Oliver, L., Wieck, L., & Scholten, E. (2016). Influence of matrix inhomogeneity on the rheological properties of emulsion-filled gels. *Food Hydrocolloids*, 52, 116–125. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.06.003>.
- Patel, A. R., Dumlu, P., Vermeir, L., Lewille, B., Lesaffre, A., & Dewettinck, K. (2015). Rheological characterization of gel-in-oil-in-gel type structured emulsions. *Food Hydrocolloids*, 46, 84–92. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.12.029>.
- Pazos, M., Alonso, A., Sánchez, I., & Medina, I. (2008). Hydroxytyrosol prevents oxidative deterioration in foodstuffs rich in fish lipids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(9), 3334–3340. <http://dx.doi.org/10.1021/jf073403s>.
- Pintado, T., Ruiz-Capillas, C., Jiménez-Colmenero, F., Carmona, P., & Herrero, A. M. (2015). Oil-in-water emulsion gels stabilized with chia (*Salvia hispanica* L.) and cold gelling agents: Technological and infrared spectroscopic characterization. *Food Chemistry*, 185, 470–478. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.04.024>.
- Pripp, A. H., Vreeker, R., & van Duynhoven, J. (2005). Binding of olive oil phenolics to food proteins. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(3), 354–362. <http://dx.doi.org/10.1002/jsf.1992>.
- Salcedo-Sandoval, L., Cofrades, S., Ruiz-Capillas, C., Matalanis, A., McClements, D. J., Decker, E. A., & Jiménez-Colmenero, F. (2015). Oxidative stability of n-3 fatty acids encapsulated in filled hydrogel particles and of pork meat systems containing them. *Food Chemistry*, 184, 207–213. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.093>.
- Sato, A. C. K., Moraes, K., & Cunha, R. L. (2014). Development of gelled emulsions with improved oxidative and pH stability. *Food Hydrocolloids*, 34(1), 184–192. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.10.016>.
- Serrano, A., Cofrades, S., & Jiménez-Colmenero, F. (2006). Characteristics of restructured beef steak with different proportions of walnut during frozen storage. *Meat Science*, 72(1), 108–115. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2005.06.008>.
- Tepsongkroh, B., Hansilawat, T., Maisuthisakul, P., & Chantapornchai, W. (2015). Influence of polyglycerol polyricinoleate and biopolymers on physical properties and encapsulation efficiency of water-in-oil-in-water emulsions containing mango seed kernel extract. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 36(8), 1126–1133. <http://dx.doi.org/10.1080/01932691.2014.956116>.
- Weiss, J., Scherze, I., & Muschiolik, G. (2005). Polysaccharide gel with multiple emulsion. *Food Hydrocolloids*, 19(3), 605–615. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2004.10.023>.
- Yang, M., Liu, F., & Tang, C.-H. (2013). Properties and microstructure of transglutaminase-set soy protein-stabilized emulsion gels. *Food Research International*, 52(1), 409–418. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2011.11.012>.

APARTADO 4.2.

Utilización de emulsiones dobles y dobles gelificadas como estrategia de desarrollo de productos cárnicos funcionales

APARTADO 4.2.1.

ARTÍCULO 5

Double emulsions to improve frankfurter lipid content: impact of perilla oil and pork backfat

Freire, M., Bou, R., Cofrades, S., Solas, M. T. and Jiménez-Colmenero, F. (2016). Journal of the Science of Food and Agriculture **96**: 900-908.

Double emulsions to improve frankfurter lipid content: impact of perilla oil and pork backfat

María Freire,^a Ricard Bou,^{a*} Susana Cofrades,^a María Teresa Solas^b and Francisco Jiménez-Colmenero^a

Abstract

BACKGROUND: The technology involving the use of water-in-oil-in-water double emulsions (DEs) offers an interesting approach to improve the fat content of foods. With this aim, the effect on frankfurter properties of replacing pork backfat with two different DEs prepared using perilla oil and pork backfat as lipid phases was assessed. This strategy was compared with straightforward addition of the lipid source and addition by means of an oil-in-water (O/W) emulsion.

RESULTS: As compared with all-pork-fat frankfurters, the ones with perilla oil had a higher proportion of *n*-3 polyunsaturated fatty acids. Reduced-fat frankfurters had similar water- and fat-binding properties irrespective of the lipid source or the technological strategy used to incorporate it. Moreover, the oil source but not its mode of incorporation determined the oxidation levels of frankfurters. In reduced-fat samples, except in the case of frankfurters formulated with a perilla oil-in-water emulsion, hardness was unaffected either by the type of fat or by its mode of incorporation. The replacement of pork backfat by perilla oil reduced the overall acceptability of products when perilla oil was added by means of the O/W emulsion and DE approaches.

CONCLUSION: This technology is suitable for labelling meat products with specific nutritional and health claims.

© 2015 Society of Chemical Industry

Keywords: double emulsion; perilla oil; functional ingredient; low-fat meat products

INTRODUCTION

Reformulation of meat derivatives is one of the strategies that have been studied in order to develop healthier and functional meat products.¹ Comminuted cooked meat products (such as frankfurters) are a commercially important group of products which have been widely subjected to different reformulation approaches aimed at achieving better lipid compositions. These approaches entail reducing the fat content and/or replacing (to a greater or lesser extent) the animal fat which is normally present in the product with other fat (of terrestrial and/or marine origin) whose characteristics are more in line with health recommendations.^{2,3} This includes diets with smaller proportions of saturated fatty acids (SFA) and larger proportions of monounsaturated fatty acids (MUFA) or polyunsaturated fatty acids (PUFA, especially long-chain *n*-3 PUFA), better *n*-6/*n*-3 PUFA and PUFA/SFA ratios and, if possible, cholesterol-free.

To that end, different technology options for animal fat replacement have been assayed to develop healthier-lipid meat products.¹ In this regard, the use of water-in-oil-in-water (W/O/W) double emulsions (DEs) as food ingredients offers an interesting and unexplored technological strategy to optimize dietary active components in new food systems such as meat-based functional foods.⁴

W/O/W emulsions consist of minute water particles (W_1) dispersed inside fat globules (O), which in turn are dispersed in an outer continuous aqueous phase (W_2). These multi-compartmentalized systems offer some advantages for

food applications, since this has been found to be a potentially useful strategy for masking flavours, preventing oxidation, improving sensory characteristics of foods or controlling the release of and protecting labile ingredients during eating and digestion.^{5–8} Moreover, DEs can be used to modify qualitative and quantitative aspects of the lipid material in foods, improving their content through two main approaches: by reducing the fat content and by providing healthier fatty acid profiles. Therefore the replacement of animal fat normally present in some foods (e.g. meat products) or the choice of the most suitable lipid phase (in terms of health recommendations) with these new food ingredients opens up a promising line of research for producing healthier and functional foods.⁴ However, there has been very little use of DEs as fat replacers (food ingredients) in reformulation processes to produce improved-fat foods, including meat products.^{9,10}

In meat reformulation processes, the replacement of animal fat by a DE prepared with the same fat as the lipid phase offers a potential strategy to produce reduced-fat meat products with similar physicochemical and sensory properties to full-fat products.^{4,10}

* Correspondence to: Ricard Bou, Institute of Food Science, Technology, and Nutrition; Jose Antonio Novais, 10, E-28040 Madrid, Spain.
E-mail: ricard_bou@ictan.csic.es

a Institute of Food Science, Technology, and Nutrition (ICTAN-CSIC), E-28040 Madrid, Spain

b Facultad de Biología (UCM), Ciudad Universitaria, E-28040 Madrid, Spain

Conversely, the use of other lipid sources such as perilla oil can serve additionally to improve the fatty acid composition of sausages and is thus a much more useful strategy from a nutritional point of view. In this context, perilla oil (produced from *Perilla frutescens* seeds) is of special interest as it is one of the richest sources (>60 g per 100 g) of α -linolenic acid, with demonstrated preventive effects on atherosclerosis and chemically induced cancer as well as beneficial effects on immune and mental functions. The health benefits of perilla oil are partially explained by its high linolenic acid content, but it seems to have other impacts on lipid metabolism via regulation of the expression of transcription factors.¹¹ Despite these health benefits, its use as a food ingredient in meat processing has been limited.¹² To the best of our knowledge, there are no studies on the use of pork backfat and perilla oil in DE preparation and its utilization to improve the fat content in meat products.

In order to verify the possibility of using DE technology and perilla oil as a strategy to improve the fat content (via lipid content reduction and fatty acid profile improvement) in comminuted meat products, the objective of this study was to assess the effect on frankfurter properties (fat- and water-binding properties, texture, colour and sensory analysis) by replacing pork backfat with W/O/W emulsions. Two different DEs were prepared using pork backfat and perilla oil as lipid phases. A comparative study was also conducted of the effect on frankfurter properties of pork backfat replacement by perilla oil as affected by its incorporation conditions (in liquid form, as part of an oil-in-water (O/W) emulsion or in a DE).

MATERIALS AND METHODS

Raw materials, ingredients and additives

A representative amount (~25 kg) of fresh post-rigor pork meat (mixture of trimmed *biceps femoris*, *semimembranosus*, *semitendinosus*, *gracilis* and *adductor*) and pork backfat from different animals was obtained from a local market. The meat was trimmed of visible fat and connective tissue. Meat and backfat were passed through a grinder with a 0.6 cm plate (Mainca, Granollers, Spain). Randomized lots of approximately 500 g were vacuum packed, frozen and stored at -20°C until used.

Perilla oil (Nutracell Perilla, Grupo Nutraceutico ChiaSa SL, Meliana, Spain) and rendered pork backfat (obtained by heating ground pork backfat at 70°C for 30 min in a water bath and filtering through cheesecloth) were used as lipid sources in the preparation of DEs. Sodium caseinate with 86.4 g protein content per 100 g (Excellion EM 7, FrieslandCampina DMV, Veghel, The Netherlands) was used as a hydrophilic emulsifier in both O/W and W/O/W emulsions. The lipophilic surfactant used was polyglycerol polyricinoleate (SUGIN 476/M, Cargill SLU, Martorell, Spain). Soy protein isolate containing 90 g protein per 100 g (Manuel Riesgo SA, Madrid, Spain) was used for the preparation of frankfurters. Other additives included sodium chloride (Panreac Quimica SA, Barcelona, Spain), sodium tripolyphosphate (Manuel Riesgo SA), sodium nitrite (Fluka Chemie GmbH, Buchs, Switzerland) and flavouring (Gewürzmüller GmbH, München, Germany).

Oil-in-water emulsion preparation

A simple (O/W) emulsion was prepared following the method described by Hoogenkamp.¹³ First, 8 parts of water were mixed with 1 part of sodium caseinate for 35 s in a Thermomix TM-31 food processor (Vorwerk, Wuppertal, Germany) at setting 6 (3100 rpm).

The mixture was then emulsified for 10 min with 10 parts of perilla oil. The O/W emulsion contained 52 g per 100 g perilla oil. This type of emulsion is widely used in reformulation processes as a strategy for achieving healthier meat products.¹

Water-in-oil-in-water emulsion preparation

Two $W_1/O/W_2$ emulsions were prepared following the procedure described by Cofrades *et al.*⁹ with minor modifications. In both cases the inner (W_1) phase consisted of a 0.1 mol L^{-1} aqueous solution of NaCl. The outer (W_2) phase was prepared by dispersing 0.1 mol L^{-1} NaCl plus 0.5 g sodium caseinate per 100 mL tap water at room temperature until fully dissolved and then stored overnight at 4°C . The lipid phase (O) consisted of 94 g per 100 g perilla oil or rendered pork backfat plus polyglycerol polyricinoleate (6 g per 100 g). The lipid phases were mixed for 15 min at 60°C in a Thermomix TM-31 food processor (Vorwerk) at setting 5 (2000 rpm). A two-step procedure was used to prepare stable DEs. Two primary coarse emulsions (W_1/O) were prepared by drop-wise addition of the inner (W_1) aqueous phase (20 g per 100 g) to the perilla oil or rendered pork backfat lipid phase (80 g per 100 g) contained in the Thermomix food processor set at $60^{\circ}\text{C}/15\text{ min}/3100\text{ rpm}$. Each primary coarse emulsion was passed twice through a two-stage high-pressure homogenizer (Panda Plus 1000, GEA NiroSoavi, Parma, Italy) at 55 000/7000 kPa. The resulting primary fine emulsions (W_1/O) were then allowed to cool at room temperature before preparation of the DEs. These were prepared by gradually adding each W_1/O fine emulsion (40 g per 100 g) to the outer (W_2) aqueous phase (60 g per 100 g) in the Thermomix food processor set at $37^{\circ}\text{C}/500\text{ rpm}$. The resulting coarse $W_1/O/W_2$ emulsions were passed twice through the two-stage high-pressure homogenizer (Panda Plus 1000) at 15 000/3000 kPa to obtain the final DEs containing perilla oil or rendered pork backfat (PO-DE and PB-DE respectively). As formulated, both DEs had a fat content of 30 g per 100 g.

Design and preparation of frankfurters

Six different frankfurter-type sausages were formulated as indicated in Table 1. A meat batter formula was prepared with 21 g per 100 g pork backfat to produce a normal-fat frankfurter-type sausage (N-PB), and this was compared with five other formulation approaches designed to produce healthier-fat sausages. These approaches differed in the type of lipid material (pork backfat or perilla oil) and their mode of incorporation (direct addition or addition by means of either O/W or W/O/W emulsion technology). With the exception of the control, meat batters were designed to have similar, reduced fat levels. However, one fundamental requirement of the design and reformulation of these products as regards potential health benefits is that the lipid content and lipid profile of the resulting frankfurters (the ones formulated with perilla oil) make a serious contribution to the recommended intake levels when consumed in normal amounts. Consequently, the products of the meat batter formulations described here were reduced-fat frankfurters with either (i) straightforward addition of PB (R-PB) or addition of PB by means of W/O/W emulsion technology (R-PB-DE) or (ii) straightforward addition of liquid perilla oil (R-LPO) or addition of perilla oil by means of O/W emulsion technology (R-PO-SE) or W/O/W emulsion technology (R-PO-DE) (Table 1).

Meat and pork backfat packages were thawed ($\sim 18\text{ h}$ at $2 \pm 2^{\circ}\text{C}$) before use. Preparation of the frankfurters was as described by Delgado-Pando *et al.*¹⁴ Briefly, raw meat material was homogenized and ground for 1 min in a chilled (2°C) cutter

Table 1. Formulation of frankfurter-type sausages

Sample ^a	Meat (g)	Pork backfat		Perilla oil			Water (g)
		Added fat (g)	W/O/W (g)	Added oil (g)	O/W (g)	W/O/W (g)	
N-PB	1170	378	0	0	0	0	192.4
R-PB	1170	180	0	0	0	0	390.4
R-PB-DE	1170	0	486	0	0	0	84.4
R-LPO	1170	0	0	145.8	0	0	424.6
R-PO-SE	1170	0	0	0	288	0	282.4
R-PO-DE	1170	0	0	0	0	486	84.4

^a N-PB, normal-fat sausage formulated with pork backfat (all animal fat); R-PB, reduced-fat sausage formulated with pork backfat (all animal fat); R-PB-DE, reduced-fat sausage formulated with rendered pork backfat incorporated in a double emulsion (DE, W/O/W) (all animal fat); R-LPO, reduced-fat sausage prepared by addition of liquid perilla oil (LPO); R-PO-SE, reduced-fat sausage formulated with perilla oil in a simple emulsion (SE, O/W); R-PO-DE, reduced-fat sausage formulated with perilla oil in a double emulsion (DE, W/O/W). The following were also added to all batters: 27 g of NaCl, 5.4 g of sodium tripolyphosphate; 216 g of sodium nitrite; 18 g of soy protein isolate and 9 g of flavouring.

(Stephan Universal Machine UM5, Stephan U. Söhne, Hameln, Germany). Depending on the formulation, half of the NaCl, sodium tripolyphosphate, sodium nitrite (the last two previously dissolved in the added water) and the lipid source – namely pork backfat, rendered pork backfat added by means of the W/O/W approach, or perilla oil added by means of the O/W or W/O/W approach – were added to the ground meat and mixed again for 1 min. The rest of the additives and ingredients (depending on the formulation) were then added and the whole mixture was homogenized for 1 min. Finally, the whole meat batter was homogenized under vacuum for 2 min. Mixing time was standardized at 5 min. The final batter temperature was below 14 °C in all cases.

The meat batter was stuffed into 20 mm diameter Nojax cellulose casings (Viscose SA, Bagnold, France) and hand-linked. Frankfurters were heat processed in an Eller smokehouse (Unimatic 1000, Micro 40, Eller, Merano, Italy) until the core of the product reached 70 °C. Heat processing conditions were established beforehand and the internal temperature was monitored throughout heating by means of thermocouples inserted in each frankfurter (thermal centre) and connected to a temperature recorder (Model 3087, Yokogawa Hokuskin Electric YEM, Tokyo, Japan). Once heating was complete, the frankfurters were pricked, cooled (at room temperature), kept in a cold room (2 °C for 14 h), vacuum packed (Cryovac® OSB3050, Sealead Air, Elmwood Park, NJ, USA) and stored at 2 ± 1 °C.

Proximate composition and fatty acid composition

Sample moisture and ash contents were determined.¹⁵ Protein content was measured with a LECO FP-2000 Nitrogen Determinator (LECO Corporation, St Joseph, MI, USA). Fat content was evaluated according to Bligh and Dyer.¹⁶ All analyses were done in duplicate.

The fatty acid composition of rendered pork backfat, perilla oil and frankfurters was determined (in duplicate) by gas chromatography as reported elsewhere.¹⁷ Boron trifluoride in methanol was used for fatty acid methyl ester (FAME) preparation. A gas chromatograph (GC-2014, Shimadzu, Kyoto, Japan) fitted with an SP-2330 capillary column (60 m × 0.25 mm i.d., 0.2 µm; Supelco, Bellefonte, PA, USA) was used with a flame ionization detector. The injector and detector temperatures were 250 and 260 °C respectively. The oven temperature was held at 140 °C for 5 min, then raised to 240 °C at a rate of 4 °C min⁻¹ and held for 20 min. Fatty acids were identified by comparison with a known standard FAME mixture (Sigma-Aldrich Química, S.L., Madrid, Spain).

Processing loss, thermal stability and pH determination

Processing loss of frankfurters was calculated in eight samples, each weighing approximately 150 g, as the weight loss (expressed as % of initial sample weight) occurring after heat processing and chilling overnight at 2 °C.

As a measure of thermal stability, the total loss (water and fat) was determined (in quadruplicate) by measuring the exudate released during heating.¹⁸ Briefly, samples (~55 g) were stuffed into 50 mL capacity tubes, which were hermetically sealed and heated in a water bath for 30 min at 70 °C. They were then opened and left to stand upside down for 50 min to release the exuded fat and water onto a plate. Total loss (exudate loss) was expressed as % of initial sample weight. The relative amount of water in the released exudate was determined as weight loss after oven drying for 16 h at 105 °C and expressed as % of total loss. The relative amount of fat loss was calculated as the difference between total loss and water loss.

The pH was determined five times using an Orion Research 720A pH meter (Instrumentación Analítica SA, Madrid, Spain) on a homogenate of 10 g of sample in 100 mL of distilled water.

Instrumental colour

CIE-LAB tristimulus values, lightness (L^*), redness (a^*) and yellowness (b^*), of frankfurter cross-sections were immediately evaluated on a CR-400 Chroma Meter (Konica Minolta Business Technologies, Tokyo, Japan). The instrument was set for standard illuminant D-65 and a 2° observer and standardized using a standard white plate. Ten determinations were performed from each formulation.

Texture profile analysis

Texture profile analysis was performed with a TA.XTPlus Texture Analyzer (Texture Technologies Corp., Scarsdale, NY, USA) as described by Bourne.¹⁹ Six frankfurter cores (20 mm height) were axially compressed to 50% of their original height. Force–time deformation curves were obtained with a 5 kg load cell applied at a crosshead speed of 1 mm s⁻¹. Attributes were calculated as follows: hardness = peak force (N) required for the first compression; cohesiveness = ratio of active work done under the second compression curve to that done under the first compression curve (dimensionless); springiness = distance (mm) that the sample recovers after the first compression; chewiness = the product of the attributes hardness, cohesiveness and springiness (N mm). Measurements were carried out at room temperature.

Oxidative stability

Lipid oxidation was evaluated by means of the thiobarbituric acid-reactive substance (TBARS) method as described elsewhere.²⁰ Briefly, 5 g of each sample was homogenized in 35 mL of 75 g L⁻¹ trichloroacetic acid (Panreac Quimica SA) for 30 s at high speed in an OmniMixer blender (ES Homogenizer, Omni International Inc., Gainesville, VA, USA). The blender sample was centrifuged (Sorvall RT6000B, DuPont, Wilmington, DE, USA) at 3000 × *g* for 2 min, then 5 mL of the supernatant was mixed with 5 mL of 20 mmol L⁻¹ thiobarbituric acid (Merck, Darmstadt, Germany). Finally, the solution was mixed and kept in the dark for 20 h at 20 ± 1.5 °C. The pink colour that formed was measured at 532 nm in a spectrophotometer (UV/VIS 1203, Shimadzu). A calibration curve was plotted with 1,1,3,3-tetraethoxypropane (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) to determine the malondialdehyde (MDA) concentration, and results were expressed as mg MDA kg⁻¹ sample. TBARS determinations were performed in duplicate.

Sensory analysis

Frankfurter-type sausages were assessed by a 20-member panel selected from the staff. The inclusion criterion was to consume this type of product at least on a monthly basis. The included panellists were familiarized with this kind of product and its evaluation. Frankfurters (2 cm long) were heated for 20 s in a microwave oven (850 W). Subsequently, all treatments were presented to panellists in random order. A hedonic scale rating test was carried out where panellists evaluated the flavour, texture and overall acceptability. The evaluation was made on 10 cm unstructured line scales with the terms 'I completely dislike' and 'I like very much' at either extreme. Vertical lines drawn by the panellists through the horizontal scale lines were converted into percentage scores. The score sheet also included a comments section. Water and crackers were provided to panellists to cleanse their palates between samples. Sensory analysis was performed 6 days after preparation of the frankfurters.

Statistical analyses

One-way analyses of variance (ANOVAs) were carried out to examine whether there were any significant differences in moisture content, fat content, protein content, ash content, fatty acid composition, processing loss, total loss, water loss, fat loss, pH, instrumental colour, texture profile parameters and TBARS as a result of the different sausage treatments (fixed factor). In addition, one-way ANOVA considering the effect of the added lipid source (pork backfat or perilla oil) in frankfurter formulation was conducted to determine differences in fatty acid composition of frankfurters. Two-way ANOVA considering the different sample formulations as a fixed effect and panellists as a random effect was used for analysis of differences in flavour, texture and overall acceptability scores. *P* values of less than 0.05 were considered significant. Tukey's honest significant difference (HSD) test was used to identify statistically significant differences, considering $\alpha < 0.05$ as significant.

RESULTS AND DISCUSSION

Proximate composition and fatty acid composition

The pork meat (21.7 g protein per 100 g, 1.4 g fat per 100 g) and pork backfat (1.0 g protein per 100 g, 93.3 g fat per 100 g) used in this experiment were according to their respective standard compositions. Some differences were observed in the proximate composition of normal-fat (N-PB) and reduced-fat (R-PB,

Table 2. Proximate composition (% w/w) of frankfurter-type sausages

Sample ^a	Moisture	Fat	Protein	Ash
N-PB	54.0a	26.8b	17.2	2.9
R-PB	66.0 cd	12.2a	18.3	2.7
R-PB-DE	65.8c	12.0a	18.8	3.0
R-LPO	67.6e	10.0a	17.9	2.8
R-PO-SE	66.1d	10.8a	18.7	2.8
R-PO-DE	64.8b	12.5a	19.0	3.1
SEM	0.06	0.84	0.40	0.10

Different letters in the same column indicate significant differences ($P \leq 0.05$; $n = 12$).

^a Sample denominations are reported in Table 1. SEM, standard error of mean.

R-PB-DE, R-LPO, R-PO-SE and R-PO-DE) frankfurters (Table 2). Moisture content was lower ($P < 0.05$) in normal-fat than in reduced-fat products (54 vs 64.8–67.6 g per 100 g), while protein and ash levels were not affected ($P > 0.05$) by the formulation (Table 2). With respect to fat content, normal-fat frankfurters recorded the highest value (26.8 g per 100 g), while mutually comparable proportions (10.0–12.5 g per 100 g) were found in reduced-fat samples. These results are consistent with the reformulation strategy, since fat reduction was basically produced by increasing water content (either from added water or from water present in the O/W or DE) with the same target muscle protein (Table 1).

There are two main aspects to be considered as regards the lipid content in modified frankfurters. First, fat reduction in frankfurters achieved an average of about 60% irrespective of the strategy and lipid source used. The energy content of the normal-fat sample (based on 9 kcal g⁻¹ for fat and 4 kcal g⁻¹ for protein) was 312.7 kcal per 100 g, of which around 78% was supplied by pork fat. In the case of reduced-fat samples the energy content was 160–172 kcal per 100 g, of which around 56% was supplied by the fat. Second, there were significant differences in the origin of the fat: while N-PB, R-PB and R-PB-DE frankfurters had all animal fat, in those formulated with perilla oil (R-LPO, R-PO-SE and R-PO-DE) the oil accounted for 70% of their fat content, with the rest coming from the meat tissue fat.

A large variety of terrestrial and marine oils (olive, cottonseed, sunflower, soybean, high-oleic sunflower, palm, fish, etc.) have been used to produce frankfurters. These lipid sources have been added in variable proportions (2–20 g oil per 100 g product) and in different ways, such as straightforward addition during product manufacture (in liquid or solid form at the end of the process), inter-esterified or by means of O/W emulsions.¹ In our study the fatty acid composition of frankfurters containing pork backfat only (N-PB, R-PB and R-PB-DE) differed greatly from that of frankfurters containing perilla oil (R-LPO, R-PO-SE and R-PO-DE) regardless of the mode of incorporation (Table 3). The most abundant fatty acids in all-pork-fat samples were MUFA, followed by SFA and PUFA. MUFA and PUFA together accounted for 60% of the total fatty acids. These results are consistent with reports on the fatty acid composition of all-pork-fat frankfurters¹⁷ and pork fat.²¹ As compared with all-pork-fat frankfurters, the products formulated with perilla oil contained less SFA (reducing the palmitic acid, 16:0, plus stearic acid, 18:0, content from 39 to 10 g per 100 g) and MUFA (reducing their proportion from 50 to 18 g per 100 g,

mainly in oleic acid, 18:1 n -9). Nonetheless, the incorporation of perilla oil caused considerable changes in PUFA contents (Table 3). Compared with all-pork-fat frankfurters, perilla oil samples contained higher ($P < 0.001$) proportions of linoleic (18:2 n -6) (8 vs 14 g per 100 g) and α -linolenic (18:3 n -3) (0.5 vs 56 g per 100 g) acids, with total n -3 PUFA levels more than 100 times higher than in all-pork-fat samples. These results are explained by the different fatty acid compositions of perilla oil (oleic, linoleic and α -linolenic acid levels of 12.5, 14.3 and 64.6 g per 100 g respectively) and pork backfat (palmitic, stearic, oleic and linoleic acid levels of 25.1, 12.2, 18.1 and 8.7 g per 100 g respectively).

According to the total fatty acid content present in lipids²² and the formulations shown in Tables 1 and 2, the amount of n -3 PUFA (α -linolenic) in frankfurters containing perilla oil was around 5.3 g per 100 g. This is of great interest, since diets with high n -6/ n -3 PUFA ratios promote the pathogenesis of many diseases, including cardiovascular diseases, cancer, etc., whereas increased n -3 PUFA content (low n -6/ n -3 PUFA ratio) exerts a suppressive effect.² In this regard, all-pork-fat samples presented an n -6/ n -3 PUFA ratio of 17, which was reduced to almost 0.3 when pork backfat was replaced by perilla oil. These results are consistent with the findings of other authors for reformulated sausages in which pork fat was replaced by different types of oil.^{17,23,24}

According to EU Regulations,²⁵ the health claim which may be made on frankfurters with added perilla oil is: *α -linolenic acid contributes to the maintenance of normal blood cholesterol levels*. This claim can be used since these foods are a source of *α -linolenic acid* as referred to in the (nutritional) claim source of *omega-3 fatty acids* as listed in the EU Regulations.^{17,24,26} The consumer must be informed that the beneficial effect is achieved with a daily intake of 2 g of *α -linolenic acid*.

Processing loss, thermal stability and pH

As shown in Table 4, processing losses ranged from 14.2 to 16.2 g per 100 g, in agreement with the losses reported in previous experiments dealing with reduced-fat frankfurters.^{17,24} The control sausage had the lowest processing loss, the same as the other reduced-fat frankfurters except for the R-PO-DE sample (Table 4). Neither the lipid source (pork backfat or perilla oil) nor the technological strategy used to incorporate it (improve fat content) affected ($P > 0.05$) the processing loss of reduced-fat frankfurters (Table 4). There were likewise no differences in total, water and fat losses of meat batters irrespective of their fat content, lipid source or mode of incorporation (Table 4). Around 93 g per 100 g of the heating loss was water loss, while only 7 g per 100 g was fat loss. Cofrades *et al.*⁹ reported that the replacement of pork backfat by a DE reduced the heating loss (from 9.6 to 5.1–6.7 g per 100 g) but did not affect the water and fat losses (around 92 and 7 g per 100 g of heating loss respectively) of model meat systems. Similarly, it has been reported that the fat level did not influence the water- and fat-binding properties of meat batters formulated with pork backfat or DE (containing olive oil), despite the fact that, as in this study, the fat reduction was accompanied by an increase in moisture level while the protein content remained essentially the same.⁹ Provided that the levels of processing losses (<17 g per 100 g) and total losses (<2 g per 100 g) shown in Table 4 are similar to other studies, this fact suggests the formation of a stable protein matrix gel, with structures associated with high-water-binding properties, irrespective of fat level, type of lipid (pork backfat and perilla oil differ in their physicochemical properties, e.g. melting points) or mode of incorporation. In this regard the different fat reduction strategies and lipid sources used are essential factors

in explaining the effect of reformulation processes on the water- and fat-binding properties of comminuted meat products. It has generally been reported that frankfurters prepared with vegetable oils had higher cooking loss than those prepared with animal fat, but it has also been reported that the cooking loss of frankfurters decreased or was not affected by the type of fat (pork or beef fat or vegetable oils) used in the formulation.²⁴

Although these properties were shown to be unaffected, the mode of lipid incorporation would affect some characteristics of the protein matrix. When pork backfat or liquid perilla oil is added to meat batters (in the case of N-PB, R-PB and R-PO samples), the lipid particles are dispersed during the comminution process, forming an O/W emulsion in which soluble meat proteins act as a hydrophilic emulsifier. When O/W or W/O/W emulsions are made prior to meat product manufacture and added as a fat ingredient to meat products (R-PO-SE or R-PB-DE and R-PO-DE respectively), more meat protein should be available to act in the system, contributing to the formation of more stable protein matrices. The changes in meat batters (mainly in myofibrillar protein structure) as a consequence of heating could overcome those differences. In any case, according to Cofrades *et al.*,⁹ the results of this study show that it is technologically possible to replace animal fat with a DE in healthier-lipid frankfurters without affecting the water- and fat-binding properties.

The pH values of frankfurters ranged between 6.21 and 6.31 (Table 4), similar to those found for other meat products of this type.^{17,24,27} Although some significant differences in pH between samples were detected, these changes are of little quantitative significance.

Instrumental colour

Colour parameters were affected ($P < 0.05$) by the formulation (Table 5). Overall, all-pork-fat frankfurters had lower L^* values and higher a^* values than those containing perilla oil. In all-pork-fat samples, fat reduction reduced L^* and b^* and raised a^* ($P < 0.05$). However, there are no changes in colour parameters when comparing the reduced-fat frankfurters in which pork backfat was added directly with those in which this fat was added in the form of a DE. As in this experiment, various authors have reported that a reduction in fat level (and increased water content) generally favours increased redness and reduced lightness.^{28,29} However, it has also been reported that no differences were found in some of the colour parameters associated with fat level.³⁰

There are numerous studies dealing with the effect of O/W emulsions on meat colour. In these cases the differences in the colour of reformulated products with O/W emulsions were related to the type of meat matrix, the product formulation, the characteristics of the oils assayed and the emulsifying oil stabilizing system (differences in the colour of pork backfat and O/W emulsions).^{17,27} In the present study the effect of the mode of incorporation of DEs on frankfurter colour varied with the lipid source (Table 5). In the case of the DE prepared with pork backfat as lipid phase, there were no differences in colour parameters. Conversely, the incorporation of perilla oil in a DE induced the highest L^* value and the lowest a^* value ($P < 0.05$). Cofrades *et al.*⁹ reported that lightness and yellowness were generally higher and redness lower in samples where pork backfat had been replaced by DEs (olive oil as lipid phase). Therefore the lipid and the protein system used as a hydrophilic emulsifier in the formation of simple and double emulsions can affect the colour parameters of meat products.

Table 3. Effect of addition of pork backfat or perilla oil on fatty acid composition (% of total fatty acids) of frankfurters

Fatty acid ^b	Pork backfat ^a			Perilla oil ^a			SEM ^c	p ^d
	N-PB	R-PB	R-PB-DE	R-LPO	R-PO-SE	R-PO-DE		
16:0	26.07b	25.98b	26.23b	7.81a	7.54a	8.11a	0.09	<0.001
16:1n-7	2.43b	2.41b	2.29b	0.43a	0.39a	0.37a	0.01	<0.001
18:0	13.05b	12.90b	13.49c	2.76a	2.66a	3.11a	0.05	<0.001
18:1n-9	43.06c	42.79c	41.58b	15.84a	15.52a	15.88a	0.10	<0.001
18:1n-7	3.46bc	3.53c	3.39b	1.25a	1.23a	1.32a	0.01	<0.001
18:2n-6	7.44a	8.08b	8.30b	14.30c	14.29c	14.79d	0.03	<0.001
18:3n-3	0.40a	0.45a	0.50a	56.67c	57.40c	55.14b	0.11	<0.001
ΣSFA	40.87b	40.51b	41.29b	10.93a	10.50a	11.55a	0.13	<0.001
ΣMUFA	50.48c	50.20c	48.84b	17.86a	17.46a	17.89a	0.12	<0.001
Σn-6 PUFA	8.23a	8.70ab	9.30b	14.54c	14.57c	15.36d	0.05	<0.001
Σn-3 PUFA	0.47a	0.48a	0.57a	56.67c	57.47c	55.20b	0.11	<0.001
n-6/n-3	17.49b	18.24b	16.76b	0.26a	0.25a	0.28a	0.32	<0.001

Different letters in the same row indicate significant differences ($P \leq 0.05$; $n = 12$).
^a Sample denominations are reported in Table 1.
^b SFA, saturated fatty acids; MUFA, monounsaturated fatty acids; PUFA, polyunsaturated fatty acids.
^c Standard error of mean.
^d P values of the ANOVA determining the effect of addition of pork backfat or perilla oil.

Table 4. Processing loss, thermal stability and pH of frankfurter-type sausages

Sample ^a	Processing loss (g per 100 g)	Thermal stability			pH
		Total loss (g per 100 g)	Water loss (g per 100 g)	Fat loss (g per 100 g)	
N-PB	14.2a	0.9	92.4	7.6	6.22a
R-PB	14.9ab	1.3	93.2	6.8	6.21a
R-PB-DE	14.7ab	1.7	92.7	6.1	6.27b
R-LPO	15.2ab	1.5	93.5	6.5	6.28b
R-PO-SE	14.9ab	1.1	93.5	6.5	6.31c
R-PO-DE	16.2b	0.8	93.1	6.9	6.28b
SEM	0.40	0.21	0.64	0.39	0.01

Different letters in the same column indicate significant differences ($P \leq 0.05$; $n = 24$).
^a Sample denominations are reported in Table 1.

Texture

Texture parameters of frankfurters were affected ($P < 0.05$) by sample formulations (Table 5). In comparison with the normal fat content, hardness decreased in frankfurters with reduced fat content. The effect produced by differing fat content has been attributed to the characteristics of the matrix formed in each case. When fat content is reduced by increasing the amount of water (Table 2) while maintaining protein levels, this leads to the formation of a less dense and less compact protein matrix, a structure associated with softer products.^{28,31,32} Since the composition (including muscle protein content) of reduced-fat samples was very similar in all systems (Table 2), the differences in textural properties between these samples must be determined mainly by the type of lipid source and the characteristics of each mode of oil incorporation and its role in the meat protein matrix. In reduced-fat samples, except for R-PO-SE frankfurters, the lipid source and its mode of incorporation had no effect on hardness (Table 5). However, Cofrades *et al.*⁹ reported that the replacement of pork backfat by a DE (olive oil) produced harder structures in model meat systems. R-PO-SE frankfurters were harder than their reduced-fat homologues, and the hardness of the meat matrices was closer to that of the normal-fat product. R-PO-SE frankfurters contained more caseinate, and this

could have contributed to greater interaction with the myofibrillar proteins, thus reinforcing the sausage gel.³³ As in this experiment, Delgado-Pando *et al.*¹⁷ showed that the replacement of pork backfat by a healthier O/W emulsion caused an increase in hardness in comparison with frankfurters containing the same amount of added pork backfat.

Frankfurter cohesiveness and springiness behaved similarly (Table 5). The lowest values were observed in the control sausage, and thus the reduction of fat enhanced these parameters, which could be partly explained by the replacement of fat at the expense of water. However, frankfurters with reduced pork backfat content registered lower values than reduced-fat frankfurters with perilla oil regardless of the mode of incorporation. These results are in line with a report by Delgado-Pando *et al.*¹⁷ who found no changes in reduced-fat frankfurters in which pork backfat had been replaced with oils having a healthier lipid profile by means of different stabilization systems. Therefore these parameters seemed to be mainly determined by the nature of the oil used. As chewiness is dependent on the above-cited parameters, the result was that control and R-P-SE frankfurters had the highest attribute values, whereas the lowest were found in reduced-fat frankfurters with pork backfat (Table 5). Sausages with R-PO-SE

Table 5. Instrumental colour parameters, texture profile analysis parameters and oxidative status (TBARS) of frankfurter-type sausages

Sample ^a	Lightness (L*)	Redness (a*)	Yellowness (b*)	Hardness (N)	Cohesiveness (dimensionless)	Springiness (mm)	Chewiness (N mm)	TBARS (mg MDA kg ⁻¹)
N-PB	75.5b	7.20d	8.69b	47.98c	0.666a	7.79a	249c	0.24a
R-PB	72.9a	7.91e	8.22a	39.91a	0.672ab	8.12b	217ab	0.26a
R-PB-DE	73.4a	7.79e	8.30a	37.04a	0.676b	8.22b	206a	0.25a
R-LPO	75.6bc	6.87c	8.81b	37.15a	0.695c	8.59c	222b	0.57b
R-PO-SE	76.4c	6.58b	8.81b	44.17b	0.689c	8.63c	263c	0.69b
R-PO-DE	77.9d	5.94a	8.72b	38.57a	0.690c	8.45c	225b	0.58b
SEM	0.26	0.093	0.086	0.68	0.002	0.051	3.6	0.41

Different letters in the same column indicate significant differences ($P \leq 0.05$; $n = 60, 36$ and 12 for instrumental colour parameters, texture profile parameters and oxidative status respectively).

^a Sample denominations are reported in Table 1.

displayed similar chewiness to that of the control, whereas the other frankfurters containing perilla oil registered lower values.

Oxidative status

The oxidative status of frankfurters is strongly influenced by the type of fat used in the formulation (Table 5). All-pork-fat frankfurters had lower ($P < 0.05$) TBARS values than those containing perilla oil. Samples formulated with pork fat only had similar levels of lipid oxidation irrespective of the fat content and the technological strategy used to incorporate pork backfat. Similarly, the mode of incorporation of perilla oil had no effect on lipid oxidation of frankfurters. This difference can be attributed to an intrinsic oxidation ability of frankfurters associated with their particular fatty acid profiles (Table 3). The reason for this is that TBARS values were higher in perilla oil than in pork backfat and therefore affected the oxidative status of the corresponding frankfurters.

Despite the fact that oxidation values of frankfurters containing perilla oil were approximately double those of samples made with pork backfat, the recorded TBARS range lies within the limits reported at the initial time in other cooked cured meat products in which the PUFA in the lipid profile had been increased^{23,34} or the fat content had been reduced and replaced by vegetable oils.³⁵ Delgado-Pando *et al.*²⁰ reported that lipid oxidation can vary according to the type of protein system (e.g. caseinate, whey protein isolate, or both combined with transglutaminase) used as a hydrophilic emulsifier to stabilize O/W emulsions which in turn have been added as pork backfat replacers. In our study we found no differences in lipid oxidation among samples with the same lipid source but with different modes of incorporation (Table 5). In this connection, Poyato *et al.*³⁶ reported that the oxidative stability of W/O/W and O/W emulsions containing olive oil or linseed oil was similar when the same lipid phase was compared.

It is worth noting that these oxidation values are below 1.0, which is the accepted threshold for rancidity in meat products.^{37,38} In fact, it is rare to find oxidative stability problems in cured gel/emulsion meat products with relatively unsaturated lipid profiles. This is due to several factors, including the addition of nitrite, phosphate, ascorbate, sodium caseinate and soy protein isolates and the natural presence of various antioxidant substances (tocopherols, phenolic compounds) in the plant oils used.^{1,39,40}

Sensory analysis

Reformulation affected the evaluation of sensory parameters of the frankfurters (Table 6). No differences were observed in flavour

Table 6. Sensory evaluation of acceptability of frankfurter-type sausages

Sample ^a	Flavour	Texture	Overall acceptability
N-PB	67b	57c	70d
R-PB	64b	64c	71d
R-PB-DE	57ab	61c	63 cd
R-LPO	54ab	48bc	51bc
R-PO-SE	54ab	29ab	38ab
R-PO-DE	39a	28a	29a
SEM	5.0	4.9	4.5

Different letters in the same column indicate significant differences ($P \leq 0.05$; $n = 120$).

^a Sample denominations are reported in Table 1.

scores between all-pork-fat samples (irrespective of fat content and mode of incorporation) and the ones made with perilla oil added in liquid form (R-LPO) or as an O/W emulsion (R-PO-SE). Moreover, these samples scored above 50% of the average for acceptability. Incorporation of the DE prepared with perilla oil produced the lowest flavour scores in frankfurters, although no differences were observed when compared with pork backfat added by means of the DE approach (R-PB-DE) or when perilla oil was used regardless of the system of incorporation (Table 6). Flavour has been reported to be unaffected by the reduction of animal fat, the nature of the oil added by means of the O/W emulsion approach or the proteinaceous system used to stabilize the emulsified oil.^{17,35}

Texture scores for all-pork-fat samples (irrespective of fat content and mode of incorporation) and the sample prepared with liquid perilla oil (R-LPO) were similar, ranging between 48 and 64 (Table 6). Texture scores were lower for frankfurters with added perilla oil than for all-animal-fat samples, although only significantly so when the perilla oil was added in an O/W emulsion (R-PO-SE) or in a W/O/W emulsion (R-PO-DE). These results are difficult to explain (only in textural terms) as they are not consistent with the data reported in Table 5. Bishop *et al.*³⁹ found no differences in texture of reduced-fat frankfurters in which the pork fat was reduced at the expense of water or reduced at the expense of water and replaced by corn oil-in-water emulsion. Similar results were reported by Choi *et al.*³⁵ regarding juiciness and tenderness of reduced-fat frankfurters. Conversely, Delgado-Pando *et al.*¹⁷

reported a decrease in texture scores when pork fat was replaced by an oil mixture with a healthier fatty acid composition which was stabilized by means of different O/W emulsion systems. Overall, these results suggest that the effect on texture depends on various factors such the nature of the oil used and the mode of incorporation.

All-pork-fat frankfurters achieved similar overall acceptability, with scores above 50 (Table 6). As in the case of texture evaluation, the replacement of pork backfat by perilla oil reduced the overall acceptability of products, but only significantly when the perilla oil was added in an O/W emulsion (R-PO-SE) or a W/O/W emulsion (R-PO-DE). As in the case of all-pork-fat samples, panellists found acceptable (scores above 50) those frankfurters prepared by adding liquid perilla oil (R-LPO). It is known that the replacement of animal fats with more unsaturated lipid sources has some important drawbacks and poses technological difficulties such as increased susceptibility to oxidation and oil loss.¹ Choi *et al.*³⁵ reported no difference in overall acceptability between control frankfurters with normal fat content and reduced-fat frankfurters containing different oils (olive, grape seed, corn and canola) stabilized in an O/W emulsion, whereas overall acceptability of frankfurters with soybean oil was lower. These authors associated that difference with the increased TBARS value (0.74 mg kg⁻¹). The type of fat and the increased oxidation values (Tables 2 and 5) may partly explain the low flavour and overall acceptability scores recorded for R-PO-SE and R-PO-DE frankfurters (Table 6). However, these may not be the only factors determining overall acceptability, given that in frankfurters with added perilla oil the use of technologies designed to stabilize lipid losses during cooking reduced acceptability scores (Table 6). The relatively increased hardness of frankfurters with perilla oil-in-water emulsion (R-PO-SE) could explain the reduction of overall acceptability and texture (Tables 5 and 6). The concentration of the lipid and its nature may have contributed to an alteration of flavour and mouthfeel perception as has been reported in simple food-grade emulsions.^{41,42} It is therefore possible that composition and kinesthetic properties determined the observed differences in flavour, texture and overall acceptability. In this regard, Paneras and Bloukas,³⁷ using a trained panel, reported that in comparison with a control frankfurter with normal fat content the use of various vegetable oil-in-water emulsions (olive, corn, sunflower and soybean oils) to produce reduced fat frankfurters caused a decrease in juiciness and firmness. Moreover, Delgado-Pando *et al.*¹⁷ reported that the protein (casein, whey protein isolate or a combination of the latter plus transglutaminase) used to stabilize a PUFA-rich oil mixture to produce reduced-fat frankfurters yielded poorer texture scores. These last authors reported that frankfurters containing a caseinate emulsifier yielded similar overall acceptability to a control frankfurter with reduced pork backfat content. Therefore it is possible to produce reduced-fat meat products that are acceptable to consumers by means of different approaches. However, the results of simultaneous reduction of fat and improvement of fatty acid composition of frankfurters by adding stabilized oils through different approaches seemed to compare unfavourably with direct addition of the oil.

CONCLUSIONS

In conclusion, it is possible to reformulate frankfurters with healthier lipid content based on processing strategies. In this regard, among the technological strategies used to optimize dietary active

components (e.g. lipid) in new food systems, DEs offer an interesting approach. In the case reported here, a DE with perilla oil and pork backfat as lipid phases, as compared with a straightforward O/W emulsion, was used to reduce the fat content and/or achieve a healthier fatty acid profile. The study confirms the technological viability of these latter approaches, showing that major fat reduction (>60%) can be achieved and that products with perilla oil may qualify for labelling with specific nutritional and health claims. Overall, it was the presence of perilla oil rather than its mode of incorporation that caused the majority of the changes in the technological and sensory characteristics of frankfurters. The use of this type of DE makes it possible to produce healthier frankfurters but does not offer any great additional technological or sensory advantages over reformulations entailing the simple reduction and modification of the lipids used. However, it does present an exceptional opportunity for the encapsulation of bioactive compounds and thus its utilization needs to be complemented to this aim.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness for M Freire's predoctoral fellowship. R Bou has been supported by a contract from the JAE-postdoctoral (CSIC) Program financed in part through the European Social Fund (ESF). The authors thank C de la Mata and T Pintado for their help during the analysis and preparation of samples. This research has been supported by project AGL 2011-29644-C02-01 from the Spanish Ministry of Science and Innovation.

REFERENCES

- 1 Jiménez-Colmenero F, Healthier lipid formulation approaches in meat-based functional foods. Technological options for replacement of meat fats by non-meat fats. *Trends Food Sci Technol* **18**: 567–578 (2007).
- 2 Simopoulos AP, The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomed Pharmacother* **56**:365–379 (2002).
- 3 EFSA, Scientific Opinion on Dietary Reference Values for fats, including saturated fatty acids, polyunsaturated fatty acids, monounsaturated fatty acids, *trans* fatty acids, and cholesterol. *EFSA J* **8**(3):1461 (2010).
- 4 Jiménez-Colmenero F, Potential applications of multiple emulsions in the development of healthy and functional foods. *Food Res Int* **52**:64–74 (2013).
- 5 Benichou A, Aserin A and Garti N, Double emulsions stabilized with hybrids of natural polymers for entrapment and slow release of active matters. *Adv Colloid Interface Sci* **108/109**:29–41 (2004).
- 6 Muschliolik G, Multiple emulsions for food use. *Curr Opin Colloid Interface Sci* **12**:213–220 (2007).
- 7 Dickinson E, Double emulsions stabilized by food biopolymers. *Food Biophys* **6**:1–11 (2011).
- 8 McClements DJ, Decker EA and Weiss J, Emulsion-based delivery systems for lipophilic bioactive components. *J Food Sci* **72**:109–124 (2007).
- 9 Cofrades S, Antoniou I, Solas MT, Herrero AM and Jiménez-Colmenero F, Preparation and impact of multiple (water-in-oil-in-water) emulsions in meat systems. *Food Chem* **141**:338–346 (2013).
- 10 Bou R, Cofrades S and Jiménez-Colmenero F, Influence of high pressure and heating treatments on physical parameters of water-in-oil-in-water emulsions. *Innovat Food Sci Emerg Technol* **23**:1–9 (2014).
- 11 Jo H, Kim M, Lee J, Kim H and Song Y, Anti-atherogenic properties of emulsified perilla oil (EPO) in apo E KO mice and plasma lipid lowering effects of rice porridge containing EPO in healthy young adults. *Food Sci Biotechnol* **22**:79–85 (2013).
- 12 Muench S and Watzl B, Incorporation of ingredients rich in omega-3 fatty acids into functional meat products. *Mitteilungsblatt Bundesanstalt Fleischforschung Kulmbach* **49**:39–48 (2010).
- 13 Hoogenkamp HW, Low-calorie sausages, spreads and mousses. *Fleischerei* **40**(11):IV–V, **40**(12):III–IV (1989).

- 14 Delgado-Pando G, Cofrades S, Ruiz-Capillas C, Solas MT and Jiménez-Colmenero F, Healthier lipid combination oil-in-water emulsions prepared with various protein systems: an approach for development of functional meat products. *Eur J Lipid Sci Technol* **112**: 791–801 (2010).
- 15 AOAC, *Official Methods of Analysis of AOAC International*. AOAC International, Gaithersburg, MD (2003).
- 16 Bligh EG and Dyer WJ, A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* **37**:911–917 (1959).
- 17 Delgado-Pando G, Cofrades S, Ruiz-Capillas C and Jiménez-Colmenero F, Healthier lipid combination as functional ingredient influencing sensory and technological properties of low-fat frankfurters. *Eur J Lipid Sci Technol* **112**:859–870 (2010).
- 18 Jiménez-Colmenero F, Carballo J and Solas MT, The effect of use of freeze-thawed pork on the properties of Bologna sausages with two fat levels. *Int J Food Sci Technol* **30**:335–345 (1995).
- 19 Bourne MC, Texture profile analysis. *Food Technol* **32**:62–66, 72 (1978).
- 20 Delgado-Pando G, Cofrades S, Ruiz-Capillas C, Solas MT, Triki M and Jiménez-Colmenero F, Low-fat frankfurters formulated with a healthier lipid combination as functional ingredient: microstructure, lipid oxidation, nitrite content, microbiological changes and biogenic amine formation. *Meat Sci* **89**:65–71 (2011).
- 21 Wood JD, Richardson RI, Nute GR, Fisher AV, Campo MM, Kasapidou E et al., Effects of fatty acids on meat quality: a review. *Meat Sci* **66**:21–32 (2004).
- 22 MAFF, *Fatty Acids. Supplement to McCance & Widdowson's*. Royal Society of Chemistry, Cambridge/Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, London (1998).
- 23 Cáceres E, García ML and Selgas MD, Effect of pre-emulsified fish oil – as source of PUFA n-3 – on microstructure and sensory properties of *mortadella*, a Spanish bologna-type sausage. *Meat Sci* **80**:183–193 (2008).
- 24 Salcedo-Sandoval L, Cofrades S, Ruiz-Capillas C, Solas MT and Jiménez-Colmenero F, Healthier oils stabilized in konjac matrix as fat replacers in n-3 PUFA enriched frankfurters. *Meat Sci* **93**:757–766 (2013).
- 25 Commission Regulation (EU) No 432/2012 of 16 May 2012 establishing a list of permitted health claims made on foods, other than those referring to the reduction of disease risk and to children's development and health. *Off J Eur Union* **L136**:1–40 (2012).
- 26 Commission Regulation (EU) No 116/2010 of 9 February 2010 amending Regulation (EC) No 1924/2006 of the European Parliament and of the Council with regard to the list of nutrition claims. *Off J Eur Union* **L37**:16–18 (2010).
- 27 Jiménez-Colmenero F, Cofrades S, López-López I, Ruiz-Capillas C, Pintado T and Solas MT, Technological and sensory characteristics of reduced/low-fat, low-salt frankfurters as affected by the addition of konjac and seaweed. *Meat Sci* **84**:356–363 (2010).
- 28 Claus JR, Hunt MC and Kastner CL, Effects of substituting added water for fat on the textural, sensory, and processing characteristics of bologna. *J Muscle Foods* **1**:1–21 (1990).
- 29 Hand LW, Hollingsworth CA, Calkins CR and Mandigo RW, Effects of pre-blending, reduced fat and salt levels on frankfurter characteristics. *J Food Sci* **52**:1149–1151 (1987).
- 30 Bloukas JG and Paneras ED, Substituting olive oil for pork backfat affects quality of low-fat frankfurters. *J Food Sci* **58**:705–709 (1993).
- 31 Youssef MK and Barbut S, Fat reduction in comminuted meat products – effects of beef fat, regular and pre-emulsified canola oil. *Meat Sci* **87**:356–360 (2011).
- 32 Jiménez-Colmenero F, Barreto G, Fernández P and Carballo J, Frozen storage of Bologna sausages as a function of fat content and of levels of added starch and egg white. *Meat Sci* **42**:325–332 (1996).
- 33 Xiong YL, Blanchard SP and Means WJ, Properties of broiler myofibril gels containing emulsified lipids. *Poultry Sci* **71**:1548–1555 (1992).
- 34 Cofrades S, Salcedo-Sandoval L, Delgado-Pando G, López-López I, Ruiz-Capillas C and Jiménez-Colmenero F, Antioxidant activity of hydroxytyrosol in frankfurters enriched with n-3 polyunsaturated fatty acids. *Food Chem* **129**:429–436 (2011).
- 35 Choi Y-S, Choi J-H, Han D-J, Kim H-Y, Lee M-A, Jeong J-Y et al., Effects of replacing pork back fat with vegetable oils and rice bran fiber on the quality of reduced-fat frankfurters. *Meat Sci* **84**:557–563 (2010).
- 36 Poyato C, Navarro-Blasco I, Calvo MI, Caverio RY, Astiasarán I and Ansorena D, Oxidative stability of O/W and W/O/W emulsions: effect of lipid composition and antioxidant polarity. *Food Res Int* **51**:132–140 (2013).
- 37 Paneras ED and Bloukas JG, Vegetable oils replace pork backfat for low-fat frankfurters. *J Food Sci* **59**:725–728 (1994).
- 38 Estévez M, Ventanas S and Cava R, Oxidation of lipids and proteins in frankfurters with different fatty acid compositions and tocopherol and phenolic contents. *Food Chem* **100**:55–63 (2007).
- 39 Bishop DJ, Olson DG and Knipe CL, Pre-emulsified corn oil, pork fat, or added moisture affect quality of reduced fat bologna quality. *J Food Sci* **58**:484–487 (1993).
- 40 Faraji H, McClements DJ and Decker EA, Role of continuous phase protein on the oxidative stability of fish oil-in-water emulsions. *J Agric Food Chem* **52**:4558–4564 (2004).
- 41 Weel KGC, Boelrijk AEM, Voragen AGJ, Smit G, Burger J, Jacobs M et al., Effect of emulsion properties on release of esters under static headspace, *in vivo*, and artificial throat conditions in relation to sensory intensity. *J Agric Food Chem* **52**:6572–6577 (2004).
- 42 Vingerhoeds M, Zoet F, Nixdorf R, van Aken G and de Wijk R, How emulsion composition and structure affect sensory perception of low-viscosity model emulsions. *Food Hydrocolloids* **22**:631–646 (2008).

APARTADO 4.2.2.

ARTÍCULO 6

Gelled emulsions as delivery systems for hydroxytyrosol and n-3 fatty acids in healthy pork patties

Freire, M., Bou, R., Cofrades, S., and Jiménez-Colmenero, F. (2017). Journal of Food Science and Technology **54 (12)**: 3959-3968

Gelled double emulsions as delivery systems for hydroxytyrosol and n-3 fatty acids in healthy pork patties

M. Freire¹ · S. Cofrades¹ · V. Serrano-Casas¹ · T. Pintado¹ · M. J. Jimenez¹ · F. Jimenez-Colmenero¹

Revised: 28 July 2017 / Accepted: 7 September 2017 / Published online: 14 September 2017
© Association of Food Scientists & Technologists (India) 2017

Abstract Structuring of double emulsion offers the possibility to obtain a system with similar consistency to animal fat which is an interesting approach to improve the fat content of meat products. This article examines the suitability of gelled double emulsions (GDE) for use as a delivery system for n-3 PUFAs and hydroxytyrosol (Hxt) in pork patties. Effect of partial (MF/GDE sample) and total (LF/GDE) replacement of pork backfat with GDE with perilla oil (PO) as lipid phase and Hxt (in W1) on pork patty composition and properties was evaluated. Compared with the control sample (NF/CS), the products with PO contained less SFAs and higher proportions of LNA and ALA, and this difference augmented with the level of GDE. Addition of GDE increased Kramer shear force of cooked patties as the higher percentage of fat replaced was used. Oxidative stability of patties can be interpreted in terms of composition and structural factors, especially in relation with the use of GDE as a fat replacer. Products showed oxidation values greater than 1 after 3 days of refrigeration. NF/GDE and MF/GDE, with similar scores, were the most acceptable for the panellists. This technology is suitable for labelling meat products with nutritional and health claims.

Keywords Double emulsion · Gelled emulsion · Hydroxytyrosol · Perilla oil · n-3 fatty acids · Chilling storage

Introduction

Meat and meat products are some of the most important sources of dietary fat. As such, in view of health recommendations for optimal intake of total and unsaturated fatty acids, changes in fat contents and lipid profiles could help them to contribute more to a healthy and well-balanced diet. Multiple technological strategies to improve the fatty acid profile of meat products have been assayed to that end (Jiménez-Colmenero et al. 2015). Different vegetable oils, marine oils, or combinations of these, have been used to partially replace animal fat in meat products. However, it has been established these lipid materials have different physicochemical characteristics from habitually used meat fats, and these may detract from the quality attributes in the reformulated product.

Novel proposals for liquid phase oil stabilization and structuring have recently been reported as a basis for the development of fat alternatives that can be used to improve the fat content of reformulated systems, including meat products. The modification or restructuring of oils to create a plastic fat that has solid-like properties and also a healthier fatty acid profile is a very important area of research for both academic and industrial purposes (Dickinson 2012). In this context, the development of gelled double (W1/O/W2) emulsion (GDE)-based delivery systems offer interesting possibilities for structuring emulsions that can be used to create novel functional attributes (McClements 2012). Double emulsion (DE) offers other attractive opportunities for the food industry, among them encapsulation of hydrophilic bioactive compounds and improvement of the fat content of foods (Jiménez-Colmenero 2013). The most promising procedure for producing a GDE is to add compounds (gelatin, alginate, or transglutaminase) to the outer aqueous phase of the DE to

✉ S. Cofrades
scofrades@ictan.csic.es

¹ Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN-CSIC), C/José Antonio Novais, 10, 28040 Madrid, Spain

act as gelling agents (Jiménez-Colmenero et al. 2015). Recently our group reported the preparation and some characteristics of gelled double emulsions using a combination of gelatin and MTG (Cofrades et al. 2017).

As an animal fat alternative, perilla oil (PO) is of particular interest. PO, produced from perilla seeds (*Perilla frutescens*), is one of the richest sources of α -linolenic acid (ALA, over 60 g/100 g). It has proven effective in preventing atherosclerosis and chemically-induced cancer and also has beneficial effects on immune and mental functions (Jo et al. 2013). DE has been used with PO as lipid phase to reduce fat and achieve healthier fatty acid profiles in frankfurters (Freire et al. 2016), but unexplored additional possibilities may be achieved through their use in the development of emulsion-based structured delivery systems. However, these n-3 PUFA enriched systems are prone to oxidation and thus need to be protected since their oxidation causes nutritional loss and presents potential negative health implications. Because synthetic antioxidants may exhibit toxic properties, different natural antioxidant sources have been assayed, among them phenolic compounds such as hydroxytyrosol (Hxt). This is a hydrophilic phenolic compound that has received a lot of attention not only because it is a very potent antioxidant, but also because of the anti-inflammatory and cancer-preventive effects attributed to it (Kountouri et al. 2007). Consequently, Hxt has been used as an antioxidant to minimize oxidation in n-3 PUFA-rich foods (DeJong and Lanari 2009; Cofrades et al. 2011), including by incorporation in DEs. Recently, Cofrades et al. (2014) studied the oxidative stability of DEs containing chia oil and Hxt and that of a cooked meat system incorporating these DEs. These authors reported that the DE showed good antioxidant capacity in the early days of storage; and again, the incorporation of DE containing Hxt in cooked meat systems protected from oxidation. Flaiz et al. (2016) compared the oxidative stability of three different emulsion-based systems (simple emulsion, DE and GDE) as delivery systems for n-3 fatty acids (PO) and Hxt. These authors showed that n-3 fatty acids were efficiently protected from oxidation in all systems by the addition of Hxt.

To the best of our knowledge, there have been no studies on the use of a structured emulsion such as a GDE to improve fat content (reduce fat and improve fatty acid profile) in meat products. To verify the suitability of GDE for use as a delivery system for n-3 PUFAs and hydroxytyrosol in meat products, this study assessed the effect of partial (66%) and total (100%) replacement of pork backfat with gelled water-in-oil-in-water ($W_1/O/W_2$) emulsions (with PO as lipid phase and Hxt in the inner aqueous phase, W_1) on the composition (fatty acid profile) and properties (texture, microbiology, oxidative stability and sensory analysis) of pork patties. An all-animal-fat control sample

was used for comparative purpose. The influence of chilling storage (14 days at 2 ± 2 °C) on pork patty characteristics as affected by formulation was also evaluated.

Materials and methods

Meat raw material, ingredients and additives

Meat raw materials (pork meat and pork backfat) were obtained and prepared as described by Salcedo-Sandoval et al. (2015).

Hxt (purity $\geq 99\%$) was purchased from Seprox BIOTECH (Madrid, Spain) and perilla oil (fatty acid composition: 6% 16:0, 2% 18:0, 12% 18:1n9, 14% 18:2n6, 65% 18:3n3, according to supplier) from Grupo Nutracéutico Chiasa, SL (Meliana, Spain). Sodium caseinate (Excellion EM 7) was purchased from FrieslandCampina DMV (Veghel, The Netherlands), polyglycerol polyricinoleate (PGPR) from Bavaro Chemicals S.L. (Sant Cebrià de Vallalta, Spain), gelatin (type B, 200–220 bloom) from Manuel Riesgo, S.A. (Madrid, Spain), and microbial transglutaminase (Activa GS) from Ajinomoto (Tokyo, Japan). According to the supplier the activity of the enzyme was 47–82 units of hydroxamate/g. All other reagents and solvents used were of a suitable grade for spectrophotometric or chromatographic analyses.

Preparation of GDE

The procedure was used to prepare a stable GDE was as reported by Flaiz et al. (2016) with minor modifications in the inner and outer water phases which none of them contained sodium azide.

Design and production of pork patties

Three different formulations with three fat contents were prepared. A pork patty with normal-fat content (all pork fat) as control sample (NF/CS) containing 80% meat and 13.5% pork back fat. Additionally, medium-fat and low-fat improved lipid profile samples (MF/GDE and LF/GDE respectively) were prepared, replacing pork backfat with the same proportion of GDE (66 and 100% respectively). All samples contained NaCl (1%) and added ice-water (5.5%).

Pork patty preparation was as reported by Salcedo-Sandoval et al. (2015) with some modifications. Briefly, pork meat, backfat (previously thawed for 18 h/2 °C) and GDE were passed through a grinder with a 4.5 mm plate (Vam.Dall. Srl. Modelo FTSIII, Treviglio, Italy). The meat and half of the ingredients were placed in a mixer (Hobart mixer N-506, Hobart MFG. Co., Troy, USA) for 1 min.

After this, the other half of the ingredients was added and the whole mixed again for 1 min. Patties (80 g) were then prepared using a manual burger former. Patties were weighed (initial weight), placed in trays (Evoh PP) covered with a film (PET12 μ PP Evoh PP70 μ NPL; ILPRA Systems España S.L) and stored in modified atmosphere (80% O₂–20% CO₂) at 2 ± 2 °C for 14 days. Analyses were performed at days 1, 3, 8 and 14 of chilling storage. Eight patties (4/raw and 4/cooked) were taken at random for analysis on each of these days: four for raw sample evaluation and four for cooked sample evaluation. Patties were cooked for 2 min per side at 180 ± 2 °C in a contact grill (Princess classic multigrill type 2321, The Netherlands) up to 70 °C (centre of product). The entire patty processing procedure was replicated twice on two different days.

Proximate analysis and fatty acid profile

Moisture and ash contents were determined by the AOAC methods (2005) and fat content according to Bligh and Dyer (1959). Protein content was measured with a LECO FP-2000 Nitrogen Determinator (Leco Corporation, St Joseph, MI, USA). All analyses were done in triplicate.

The fatty acid profiles of raw and cooked patties were determined by gas chromatography as reported by Salcedo-Sandoval et al. (2014). Fatty acids expressed as, % fatty acids methyl esters, FAME, were identified by comparison of the retention times with a fatty acid standard mixture (AccuStandard FAMQ-005 (47015-U. Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA).

Texture

Kramer shear force (KSF) was performed using a TA-XT.plus Texture Analyzer (Texture Technologies Corp. Scarsdale, NY) with a Kramer shear cell attached to a 30 kg load cell (crosshead speed 80 mm/s). Measurements were made on six portions (2 × 2 cm) per formulation (on raw and cooked samples for each storage period) at room temperature. Results were expressed as maximum load per gram of sample (N/g).

Microbiological analyses

Samples were prepared in a vertical laminar-flow cabinet (model AV 30/70, Telstar, Madrid, Spain). For each patty (raw) 10 g (per replicate) was obtained and located in a sterile plastic bag (Sterilin, Stone, Staffordshire, UK) with 90 ml of peptone water (0.1%) and 0.85% NaCl (Panreac Química, S.A. Barcelona, Spain). After 2 min in a stomacher blender (Colworth 400, Seward, London, UK), appropriate decimal dilutions were pour-plated on the following media: Plate Count Agar (PCA) (Merck,

Germany) for total viable count (TVC) (30 °C for 72 h) and for Psychrotrophic bacteria (4 °C for 7–10 days); De Man-Rogosa-Sharpe Agar (MRS) (Merck, Germany) for lactic acid bacteria (LAB) (30 °C for 3–5 days); and Violet Red Bile Glucose Agar (Merck, Germany) for Enterobacteriaceae (37 °C for 24 h). The results were expressed as logarithms of colony forming units per gram (log cfu/g).

Lipid oxidation

Pork patties (raw and cooked) were assessed for oxidative stability on the basis of changes in concentrations of lipid hydroperoxides and thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) as measures of primary and secondary oxidation products, respectively. Lipid hydroperoxides of raw and cooked samples were measured in triplicate as described by Salcedo-Sandoval et al. (2015) and the results expressed as mmol hydroperoxides/kg sample. TBARS were determined in triplicate as reported by Serrano et al. (2006) and the results expressed as mg MDA/kg of sample.

Sensory analysis

A trained 19-member sensory panel, recruited among staff of the ICTAN-CSIC with previous experience in descriptive analysis, was specifically trained to evaluate, by scoring, the samples in two sessions. Patties were cooked for 2 min on a grill until the centre of the product reached 70 °C. A portion of each patty was presented to the panelists in random order with randomly assigned three-digit codes. The panel evaluated the perceived intensity of five attributes (characteristic colour, characteristic aroma, characteristic taste, hardness and juiciness) using a 10 cm unstructured line scale (“low intensity” and “high intensity”). The panelists also evaluated the overall acceptability of the pork patties using a 10-point hedonic scale from “dislike extremely” to “like extremely”. Mineral water and bread was provided to panelists to rinse their mouths between each sample. The sensory analyses were performed at day 2 of the storage.

Statistical analysis

One-way analyses of variance (ANOVA) were carried out to evaluate the statistical significance ($P < 0.05$) of the formulation and two-way ANOVA as a function of formulation and storage time using the general linear model (GLM) procedure of SPSS Statistics (v.20, IBM SPSS Inc., Chicago, IL). Formulation and storage time were assigned as fixed effects and replicate as random effect. Least squares differences were used for comparison of mean values between treatments and Tukey's HSD test to

identify significant differences ($P < 0.05$) between formulations and storage time.

Two-way ANOVA (samples and panelists) with interaction was applied to the sensory data obtained for each attribute. Individual differences among panelists were analysed by a fixed model, considering panelists as a fixed factor. One-way analysis of variance was applied to study the effect of the formulation on each of the sensory attributes. Minimum significant differences were calculated using Fisher's least significant difference (LSD) tests with a 95% confidence interval for comparison of sensory attributes. Principal component analysis (PCA) of the sensory data was conducted on the mean values of attribute intensities presenting significant differences using the Pearson's correlation matrix. PCA is a statistical tool that helps to summarize, and hence conveys the results from descriptive panel profiling better (Moussaoui and Varela 2010). Data analyses were carried out with XLSTAT 2009.4.03 (Addinsoft, Barcelona, Spain).

Results and discussion

Of the different strategies that have been reported for stabilizing and structuring edible oils in DEs (Jiménez-Colmenero et al. 2015), in this study a non-thermally-reversible hydrogel was formed on the outer aqueous phase based on a combination of gelatin/MTG. The resulting GDE presented a solid-like structure, containing concentrations of 28.2 g and 28.2 mg/100 g of the PO and Hxt respectively according to preparation conditions. This GDE was physically stable, retaining its physical appearance, and no syneresis was observed during patties processing.

Proximate analysis and fatty acid composition

The proximate analyses of raw samples were generally close to the target levels, with some significant differences from one formulation to another (Table 1). Irrespective of formulation, protein and ash contents were around 18.3 and 2.2% respectively. Moisture content increased and fat level decreased when pork backfat was partially or totally replaced by GDE (Table 1); this is consistent with the fact that the GDE contained a higher proportion of water and a lower proportion of fat than the pork backfat. Thus, moisture content was lowest ($P < 0.05$) in the control sample (NF/CS) and highest ($P < 0.05$) in LF/GDE sample. According to the experimental design, patties presented three different fat contents (Table 1). Fat levels in reformulated samples were considerably lower than in the control, approximately 25% in MF/GDE and over 40% in LF/GDE. Also, while all the lipid in NF/CS came from pork, MF/GDE and LF/GDE samples contained different

Table 1 Proximate analysis and fatty acids profile (%) of pork patties

	NF/CS	MF/GDE	LF/GDE
Moisture	64.59 ^a ± 0.43	70.17 ^b ± 0.15	72.87 ^c ± 0.14
Protein	18.12 ^a ± 0.10	18.53 ^b ± 0.18	18.21 ^{ab} ± 0.04
Fat	15.62 ^c ± 1.13	11.69 ^b ± 0.45	9.20 ^a ± 0.44
Ash	2.23 ^a ± 0.01	2.25 ^a ± 0.04	2.23 ^a ± 0.01
Fatty acid (%)			
C16:0	23.88 ^c ± 0.70	18.54 ^b ± 0.49	13.28 ^a ± 0.14
C18:0	12.26 ^c ± 0.71	9.14 ^b ± 0.65	5.87 ^a ± 0.08
ΣSFA	37.99 ^c ± 0.37	29.00 ^b ± 0.30	20.00 ^a ± 0.04
C18:1n9	44.11 ^c ± 1.06	35.47 ^b ± 0.45	24.92 ^a ± 0.35
Σ MUFA	50.64 ^c ± 0.50	40.82 ^b ± 0.21	28.99 ^a ± 0.17
C18:2n6	9.04 ^c ± 0.34	12.26 ^b ± 0.19	15.84 ^a ± 0.14
C18:3n3	0.83 ^c ± 0.04	16.31 ^b ± 0.53	33.44 ^c ± 0.25
Σ PUFA	11.37 ^c ± 0.13	30.18 ^b ± 0.21	51.01 ^c ± 0.13
PUFA/SFA	0.31 ^c ± 0.04	1.04 ^b ± 0.06	2.53 ^a ± 0.04
Σ n-6 PUFA	10.54 ^c ± 0.15	13.87 ^b ± 0.08	15.56 ^a ± 0.05
Σ n-3 PUFA	0.83 ^c ± 0.04	16.31 ^b ± 0.52	33.44 ^a ± 0.27
n6/n3 ratio	12.66 ^c ± 0.15	0.85 ^b ± 0.21	0.53 ^a ± 0.10

Sample denomination: NF/CS normal-fat content/control sample prepared with all pork fat; MF/GDE medium-fat sample prepared replacing 66% pork backfat with the same proportion of gelled double emulsion (GDE); LF/GDE low-fat sample prepared replacing 100% pork backfat with the same proportion of GDE. Since the % of fatty acid were not influenced ($P > 0.05$) by cooking, this table shows the mean values for raw and cooked products. Mean ± standard deviation. Different letters in the same row indicate significant differences ($P < 0.05$)

proportions of PO (2.5 and 3.8 g/100 g respectively), and the LF/GDE formulation contained no pork backfat. This means that, whereas NF/CS contained all animal fat, around 21 and 41% of the fat content respectively of MF/GDE and LF/GDE patties was PO.

Various authors have reported the addition of oils in different ways to achieve patties with better lipid profiles (Jiménez-Colmenero 2007). For instance, the amount of pork backfat in pork patties has been halved by direct addition of olive oil (Hur et al. 2008) and olive, avocado and sunflower oils (Rodríguez-Carpena et al. 2011). Healthier beef patties have been made with 10 or 20% fat by adding blended lipids—beef tallow combined with 43% safflower, olive or corn oil (Lowder and Osburn 2010). Lopez-Lopez et al. (2010) made beef patties (10% fat content) in which roughly 25 and 60% of pork backfat was replaced by an olive oil-in-water emulsion (52.6% oil). Patties (9% fat content) have been made with a pre-emulsified mix of olive, corn and fish oils (Martínez et al. 2012). In the line of the present experiment, gelled carrageenan containing simple emulsion have been used as solid-fat replacers in burger patties, reducing up to 41% of the total

fat content (Poyato et al. 2015). And again, Salcedo-Sandoval et al. (2015) reported fat reduction (30–86%) in pork patties by replacement of pork backfat with a healthier oil combination (olive, linseed and fish oils) bulking system based on konjac gel. However, to the best of our knowledge there has been very limited use of PO in meat products, and in no case with application to patty-type products. In one example (Freire et al. 2016), frankfurter properties were analysed to determine how these were affected by replacing pork backfat with two different types of DE in which PO and pork backfat were used as lipid phases.

The fatty acid profile (%) of patties was affected ($P < 0.05$) by formulation but not ($P > 0.05$) by cooking. For this reason Table 1 shows the mean values for raw and cooked products. All-animal-fat sample (NF/CS) presented the highest ($P < 0.05$) levels of SFAs and MUFAs (mainly oleic acid) and the lowest PUFA concentration (Table 1). In this product 62% of total fatty acids consisted of MUFAs and PUFAs, and of the latter linoleic acid (LNA) was the most abundant. This is consistent with fatty acid profiles reported elsewhere in ground pork products (Salcedo-Sandoval et al. 2014). The products formulated with PO contained less ($P < 0.05$) SFAs than the control sample (NF/CS), a difference which increased in line with the proportion of added GDE. In general, the replacement of pork backfat reduced ($P < 0.05$) the concentration of MUFAs (oleic acid) and considerably increased ($P < 0.05$) PUFAs, especially in the case of LF/GDE, with a level over 50% (Table 1). The proportions of LNA and ALA were highest ($P < 0.05$) in low fat sample (LF/GDE) containing no pork backfat. The PUFA/SFA ratio was 0.31 for all pork fat patties, which is within the ranges reported for pork products, including all pork patties (0.7–0.37) (Salcedo-Sandoval et al. 2014). As could be expected from the n-6/n-3 ratios in animal fat, the value found in all-pork-fat sample (12.66) diverged to some extent from the recommended values (<4). The n-6/n-3 ratio of reformulated patties was lower ($P < 0.05$) than in control sample (Table 1), and lowest in LF/GDE. This effect was due mainly to a strong

increase of n-3 PUFA (linolenic acid) content from PO (Table 1). The high n-3 PUFA content (estimated at over 2 g/100 g of patty in LF/GDE) suggests that there may be interesting opportunities for health claims.

Texture

Product texture was studied both raw and after cooking at each specific storage period. Both data sets can be useful in providing technological information that can help to understand the effect of the reformulation process and the cooking consequences, and therefore in the development of a new product.

KSF in raw patties was affected ($P < 0.05$) by formulation and storage time, especially formulation (Table 2). The all-animal-fat sample registered the lowest ($P < 0.05$) values of KSF, which did not change ($P > 0.05$) over storage. In MF/GDE and LF/GDE samples, KSF increased ($P < 0.05$) during storage. After 8 days the highest value ($P < 0.05$) of KSF was registered in LF/GDE. Since the KSF of cooked patties was not influenced ($P > 0.05$) by storage period, Table 2 shows the means of each formulation over the same period. These results indicate that storage did not influence the effect of heating on patty texture, as in previous finding (Salcedo-Sandoval et al. 2015). These authors found that in reformulated patties by replacement of animal fat with a healthier oil combination (olive linseed and fish oils) bulking system based on konjac gel, no differences ($P > 0.05$) were detected in texture as a function of storage time. Addition of GDE as a pork fat replacer increased ($P < 0.01$) KSF in cooked patties in proportion to the percentage of backfat replaced (Table 2), as also reported by Salcedo-Sandoval et al. (2015) using konjac gel for the same purpose.

The effect of formulation on patty texture (Table 2) can be attributed mainly to two factors, the characteristics of the matrix formed (with differences in protein/water/fat ratio), and the physicochemical characteristics of the lipid material (pork backfat versus GDE). A decrease in fat

Table 2 Kramer share force (N/g) of raw and cooked patties over storage

Samples	Raw patties				Cooked patties
	Days at 2 °C				
	1	3	8	14	
NF/CS	1.52 ^{a1} ± 0.15	1.74 ^{a1} ± 0.09	1.72 ^{a1} ± 0.11	1.78 ^{a1} ± 0.11	12.84 ^a ± 2.07
MF/GDE	1.94 ^{b1} ± 0.19	2.20 ^{b1} ± 0.09	2.16 ^{b1} ± 0.14	2.55 ^{b2} ± 0.15	17.82 ^b ± 2.79
LF/GDE	2.03 ^{b1} ± 0.17	2.42 ^{b2} ± 0.29	2.49 ^{c2} ± 0.15	3.33 ^{c3} ± 0.20	21.04 ^c ± 2.20

For sample denomination, see Table 1. Mean ± standard deviation. Since the KSF of cooked patties was not influenced ($P > 0.05$) by storage period, this table shows the means of each formulation over the storage period. Different letters in the same column and numbers in the same row indicate significant differences ($P < 0.05$)

Table 3 Microbiological analysis (log cfu/g) of raw patties over storage

Microorganism	Samples	Days at 2 °C			
		1	3	8	14
TVC	NF/CS	4.62 ^{a1} ± 0.06	4.98 ^{b2} ± 0.09	6.17 ^{a3} ± 0.04	7.37 ^{a4} ± 0.02
	MF/GDE	4.73 ^{a1} ± 0.05	4.81 ^{a1} ± 0.02	6.51 ^{b2} ± 0.03	7.59 ^{b3} ± 0.03
	LF/GDE	5.48 ^{b2} ± 0.02	5.25 ^{c1} ± 0.02	7.08 ^{c3} ± 0.00	7.93 ^{c4} ± 0.02
LAB	NF/CS	3.82 ^{a1} ± 0.02	4.17 ^{a2} ± 0.08	5.10 ^{a3} ± 0.03	6.56 ^{b4} ± 0.03
	MF/GDE	3.80 ^{a1} ± 0.00	4.27 ^{a2} ± 0.05	5.24 ^{b3} ± 0.05	6.59 ^{b4} ± 0.03
	LF/GDE	3.85 ^{a1} ± 0.05	4.28 ^{a2} ± 0.03	5.43 ^{c3} ± 0.00	6.41 ^{a4} ± 0.05
<i>Enterobacteriaceae</i>	NF/CS	3.34 ^{a1} ± 0.01	3.54 ^{a2} ± 0.04	3.98 ^{a3} ± 0.00	5.04 ^{a4} ± 0.03
	MF/GDE	3.40 ^{a1} ± 0.01	3.52 ^{a1} ± 0.03	4.17 ^{b2} ± 0.03	5.11 ^{a3} ± 0.02
	LF/GDE	3.45 ^{a1} ± 0.00	3.83 ^{b2} ± 0.15	4.25 ^{b3} ± 0.03	5.32 ^{b4} ± 0.03

For sample denomination, see Table 1. Mean ± standard deviation. Different letters (a, b, c) in the same column and different numbers (1, 2, 3) in the same row indicate significant differences ($P < 0.05$)

Table 4 Concentrations of hydroperoxides (mmol/kg sample) and thiobarbituric acid-reactive substance (TBARS) concentration (mg MDA/kg sample) of raw and cooked (after each storage period) patties over storage

Days 2 °C	Samples		
	NF/CS	MF/GDE	LF/GDE
Hydroperoxides (mmol/kg sample)			
1	1.57 ^{a1X} ± 0.08 (3.49 ^Y ± 0.14)	0.98 ^{a1X} ± 0.08 (3.81 ^Y ± 0.25)	1.01 ^{a1X} ± 0.04 (5.72 ^Y ± 0.08)
3	1.55 ^{b1X} ± 0.14 (4.14 ^Y ± 0.42)	2.27 ^{c2X} ± 0.14 (4.56 ^Y ± 0.23)	0.87 ^{a1X} ± 0.06 (5.51 ^Y ± 0.34)
8	5.52 ^{b2X} ± 0.41 (6.13 ^X ± 0.27)	4.43 ^{a3X} ± 0.18 (5.00 ^X ± 0.14)	4.34 ^{a2X} ± 0.15 (4.72 ^X ± 0.96)
14	7.36 ^{a3X} ± 0.19 (12.85 ^Y ± 0.36)	9.77 ^{b4X} ± 0.03 (17.48 ^Y ± 0.43)	9.95 ^{b3X} ± 0.16 (17.16 ^Y ± 0.67)
TBARS (mg MDA/kg sample)			
1	2.22 ^{b1X} ± 0.02 (3.01 ^Y ± 0.08)	0.98 ^{a1X} ± 0.03 (3.90 ^Y ± 0.13)	0.59 ^{a1X} ± 0.02 (3.89 ^Y ± 0.11)
3	2.39 ^{ab1X} ± 0.07 (4.48 ^Y ± 0.17)	2.83 ^{b2X} ± 0.03 (4.32 ^Y ± 0.06)	1.50 ^{a2X} ± 0.01 (4.98 ^Y ± 0.05)
8	3.72 ^{a2X} ± 0.43 (5.25 ^Y ± 0.15)	3.01 ^{a2X} ± 0.67 (3.83 ^X ± 0.03)	3.80 ^{a3X} ± 0.93 (4.03 ^X ± 0.30)
14	5.78 ^{a3X} ± 0.06 (9.18 ^Y ± 0.23)	7.17 ^{b3X} ± 0.05 (8.61 ^Y ± 0.13)	9.46 ^{c4X} ± 0.24 (11.08 ^Y ± 0.11)

For sample denomination, see Table 1. Mean ± standard deviation, in parenthesis value for each sample after heating. Raw samples with different letters (a, b, c) within the same row or numbers (1–3) in the same column indicate significant differences ($P < 0.05$). Different letters “X, Y” indicates significant differences ($P < 0.05$) between the raw and cooked sample at each storage period

content and an increase in water, with similar protein content (Table 1) will lower the “effective” concentration of the protein acting to form the meat matrix, and this is generally associated with softer structures (Jiménez Colmenero et al. 1995). The fact that the effect on texture was the opposite (Table 2) would suggest that GDE is instrumental in the formation of firmer structures. These apparent discrepancies can therefore be attributed to differences in the kind of lipid material used. Textures are generally softer when plant oils are added to beef patties and other meat products (Lurueña-Martinez et al. 2004; Keenan et al. 2015). This is presumably because oil is more liquid than the meat fats habitually used, whereas the solid lipid material used in the present experiment mimics the characteristics of these fats better, thus obviating the effect on that quality attribute in the reformulated product. In this regard, a review dealing with the potential use of solid-like

lipid structures to develop alternatives to animal fat replacement to produce healthy meat products, and specially in ground meat type patties (Jiménez-Colmenero et al. 2015), notes that the study of its effects on patty texture has been very limited. Babji et al. (1998), for instance, reported that replacement of animal fat with partially hydrogenated palm oil (as solid fat) produced softer beef burgers. More recently Salcedo-Sandoval et al. (2015) reported that KSF values of pork patties were not affected by replacement (partial or total) of pork backfat with an oil bulking system based on konjac gel.

Microbiological analysis

Microbial counts (Table 3) were affected by formulation and by storage time ($P < 0.05$). Initially all microbial counts were below 6 log cfu/g irrespective of formulation,

as reported elsewhere for this kind of meat product (Lorenzo et al. 2014; Salcedo-Sandoval et al. 2015). Microbial counts increased ($P < 0.05$) during storage, generally less in control sample and more in LF/GDE (Table 3). At the end of storage microorganism levels were lower than 8 log cfu/g and 7 log cfu/g in TVC and LAB respectively. As in this experiment, Salcedo-Sandoval et al. (2015) reported no clear connection between microbial growth and the strategy used to improve fat, either in samples with konjac gel as fat replacer (fat reduction) or in samples containing a healthier oil combination stabilized in a konjac matrix (lower fat plus healthier lipids).

Lipid oxidation

Lipid oxidation was studied both raw and after cooking in each specific storage period. This strategy serves to measure both the effect of chilling storage and the influence of cooking after a specific time in storage. Since final levels of lipid oxidation are affected by both factors, which may be interrelated, this provides information helpful to understanding the effects of reformulation and retail storage and/or the consequences of cooking.

Hydroperoxide concentrations in patties were affected ($P < 0.05$) by formulation and storage time (Table 4). At the outset of the experiment, all samples registered similar hydroperoxide levels ($P > 0.05$) irrespective of fat proportion and source. However, the increases of hydroperoxide concentration during storage were affected by formulation ($P < 0.05$), with the main variations observed at the end of storage, when patties with lower fat content but containing PO (MF/GDE and LF/GDE) registered the higher hydroperoxide level ($P < 0.05$). The difference in rates of formation of hydroperoxides of reformulated samples (as compared with control sample) is due to a combination of different fat proportions, greater susceptibility to oxidation of unsaturated fatty acid, and the antioxidant activity of Hxt. The cooking of patties generally produced an increase ($P < 0.05$) of the hydroperoxide levels in each storage period, which was generally proportionally greater the lower the concentrations of primary oxidation products in the raw sample (Table 4).

TBARS values of the different raw patties were affected ($P < 0.05$) by formulation and storage (Table 4). Initial TBARS concentration in the normal all-pork-fat content patty (NF/CS) was higher ($P < 0.05$) than the in modified sample (with less fat content) containing PO. In these conditions, it seems to have been the quantitative (amount of fat) rather than the qualitative (level of unsaturation) factor that most favoured the formation of secondary oxidation products. This result differs from the report by Salcedo-Sandoval et al. (2015), who reported that when the pork backfat was partially and totally replaced by an oil

bulking system (olive, linseed and fish), lipid oxidation levels rose in proportion with the oil in the formulation. This behaviour may be attributable to the structural characteristics of the fat replacer used in each case and the presence of antioxidant in the GDE. TBARS values increased ($P > 0.05$) during storage in all products (values >1 after 3 days of storage), generally following the same trend, but as in the case of hydroperoxide behaviour, the highest rate of increase of TBARS was observed in samples prepared with medium and reduced fat content, both containing PO. As referenced by initial TBARS values, at the end of storage the formation of secondary oxidation products increased (in %): 260 for NF/CS, 731 for MF/GDE and 1603 for LF/GDE. The higher oxidation rates found are consistent with the greater presence of unsaturated lipids in meat products in which pork backfat was replaced by GDE. As expected in each storage period, cooking generally produced an increase ($P < 0.05$) of TBARS levels, although the change was proportionally smaller in control sample (Table 4).

The oxidative stability of these meat systems can be interpreted in terms of composition and processing factors, especially as they relate to the use of GDE as a fat replacer. The potential contribution of this fat replacer to the oxidative stability of a meat system may be related to various factors. The presence of a PO lipid phase of the GDE increased the level of unsaturation, and hence susceptibility to lipid oxidation, both during storage of fresh patties and as an effect of thermal processing. Hxt has also been reported to inhibit lipid oxidation in $W_1/O/W_2$ emulsions and in different muscle-based matrixes (DeJong and Lanari 2009), including meat matrixes formulated with DE as the animal fat replacer (Cofrades et al. 2014). In this experiment the antioxidant capacity of Hxt, which seems to be related to its location at the oil–water interphase, could help to protect against oxidation of PO outside the inner aqueous phase. This compartmentalization effect means that there is less potential antioxidant capacity for non-DE-lipid materials, so that the antioxidant capacity of Hxt increases when added to the meat matrix (Cofrades et al. 2014). Also, it has been found that Hxt mainly exerts an antioxidant effect at the outset of storage (Cofrades et al. 2014), after which it is spent and hence the effect of unsaturated oils may predominate. Also, it has been found that the caseinate at the interface between the PO and the outer aqueous phase, which is used as a hydrophilic emulsifier, is highly effective in preventing lipid oxidation, due to its ability to scavenge lipid oxidation products in the lipid phase and to chelate transition metals (Matalanis et al. 2012).

The oxidative stability of PUFA-enrichment patties was studied under different retailing conditions, including fresh and pre-cooked products stored under chilling or frozen

conditions. One of the most common consumption conditions necessarily entails first chilling storage of fresh product and then cooking prior to consumption (chilling+cooking), as assayed in this experiment. Compared with chilling+cooking conditions, pre-cooking of the product followed by chilling storage (pre-cooking+chilling) offers some advantages as regards convenience and additionally extends shelf life; however, there are also some limitations in terms of oxidative stability. This is because cooking of PUFA-enriched patties promotes lipid oxidation (Poyato et al. 2015), and also there is an intensive oxidative reaction in cooked meat products during chilling storage (Ganhão et al. 2013), which could be further promoted by reheating. In fact, in chilling+cooking the oxidation level of the product upon ingestion is due to the effects induced by storage and by thermal treatment. However, both these factors are often ignored, and that limits our ability to understand the system and hence to develop more appropriate antioxidant strategies. Note that although cooking promoted lipid oxidation, the extent of that oxidation may depend on the lipid oxidation level in the raw product, which depends the composition and storage conditions (Table 4).

Sensory analysis

The sensory scores for the attributes evaluated, and overall acceptability, were subjected to two-way ANOVA (samples-S and panelists-A) with panelists considered as a fixed effect (data not shown). Panelists receive training, but there is also a significant source of variation outside of characteristic aroma and characteristic taste. It is very difficult to entirely factor out significant variations arising from individual differences (use of scales or differences in sensitivity, motivation and culture) (Carlucci and Monteleone 2001). SxA did not significantly affect the 5 attributes which according to the panel differed perceptibly from sample to sample. This means that the panel members largely agreed in their assessments of these attributes.

The analysis of differences in sensory attributes (Fig. 1) showed that total or partial replacement of pork backfat by GDE did not affect ($P > 0.05$) the juiciness of patties but produced the lowest ($P < 0.05$) score for characteristic taste. The NF/CS samples registered significantly greater colour and hardness than the MF/GDE samples. MF/GDE and NF/CS were most acceptable to the panelists. PCA was only applied to the average scores of significant attributes (aroma, taste, colour, hardness and overall acceptability). Figure 2 shows the relative positioning of the pork patties and attributes on the sensory scale generated by the panel. The biplot explained 90% of the total variability, reflecting a very close agreement among the panelists. With the separate distribution of the samples in a two-dimensional

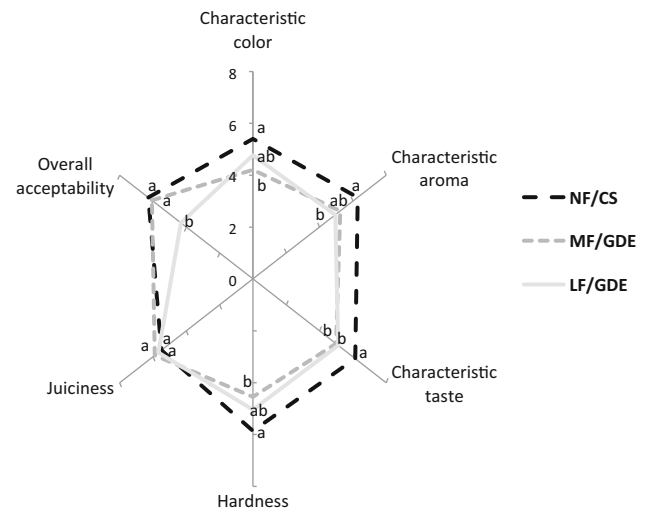


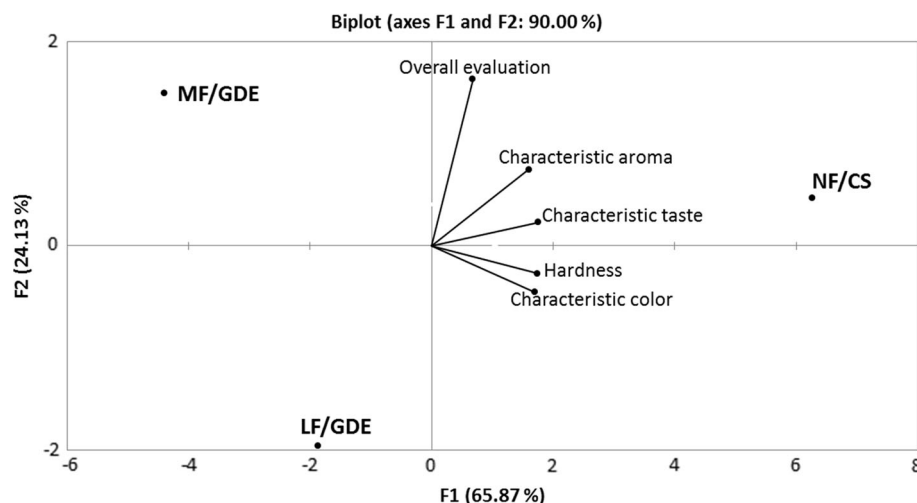
Fig. 1 Sensory attributes (10-cm unstructured line scale) of the patties. For sample denomination, see Table 1

space, PCA showed that the panelists were able to clearly discriminate among samples on the basis of the target attributes. The first component (65.87%) closely tracked aroma, taste, colour and hardness of the patties, while the second component (24.13%) shows a positive correlation with overall acceptability. The low-fat sample (LF/GDE) diverged from NF/CS to MF/GDE, mainly due to its lower acceptability due to the low scores for aroma and taste in this patty, whilst MF/GDE was situated in upper left part of the biplot, indicating high acceptability. Despite the good discrimination by the judges, a discrepancy was found in reference to the KSF (Table 2). Although hardness is apparently a simple texture property, it is part of a complex set of properties hinging on the rheological and structural (geometric and surface) attributes that are detected through mechanical, tactile and, in some cases, visual and auditory receptors (Foegeding et al. 2011). It might therefore be necessary to provide further training in the use of this descriptor, since a trained panelists can clearly learn to perceive a broader range of textures through experience (Cardello et al. 1985).

Conclusion

The replacement of pork fat by a gelled double emulsion made with PO (rich in PUFA n-3) as lipid phase and Hxt in the inner aqueous phase, as a fat substitute in pork patties proved a suitable strategy for the production of healthier lipid patties. For nutritional purposes, the changes in composition mean that products reformulated in this way (with 30% less fat than the reference product) can qualify for a “reduced fat content” claim pursuant to European Regulation (Regulation (EC) No 1924/2006). Similarly

Fig. 2 Two-dimensional PCA plot of the variations in sensorial analysis among patties. For sample denomination, see Table 1



(pursuant to Commission Regulation No 116/2010), patties with perilla oil may claim “*high omega 3 fatty acid content*” since they contain more than 0.6 g of ALA/100 g. Oxidative stability of the new meat matrix can be interpreted in terms of composition and processing factors, especially in association with the use of GDE as a fat replacer. The presence of PO as the lipid phase in a GDE increases susceptibility to lipid oxidation during storage of fresh patties and as an effect of thermal processing. The antioxidant capacity of Hxt seemed to be related to its location at the oil–water interphase. The sensory quality of patties with partial replacement of pork fat was generally similar to that of normal fat content (all animal fat) samples; however, when pork backfat was entirely replaced by the GDE, sensory acceptability decreased.

Acknowledgements This research was supported by projects AGL2014-53207-C2-1-R and Intramural Project CSIC 201470E056 from the Spanish Ministry of Science and Innovation. M. Freire greatly thanks her FPI fellowship No. BES-2012-057977 from Ministerio de Economía y Competitividad. V. Serrano-Casas thanks Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), Mexico, for the Grant No. 300614 for this research stay in Spain. We are grateful to the Analysis Service Unit facilities of ICTAN for the analysis of Chromatography.

References

- AOAC (2005) Official methods of analysis, 18th edn. AOAC, Maryland
- Babji AS, Alina AR, Chempaka MYS, Sharmini T, Basker R, Yap SL (1998) Replacement of animal fat with fractionated and partially hydrogenated palm oil in beef burgers. *Int J Food Sci Nutr* 49:327–332
- Bligh EG, Dyer WJ (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Phys* 37:911–917
- Cardello AV, Maller O, Kapsalis JG, Segars RA, Sawyer FM, Murphy C, Moskowith HR (1985) Perception of texture by trained and consumer panelists. *J Food Sci* 47:1186–1197
- Carlucci A, Monteleone E (2001) Statistical validation of sensory data: a study on wine. *J Sci Food Agric* 81:751–758
- Cofrades S, Salcedo Sandoval L, Delgado-Pando G, Lopez-Lopez I, Ruiz-Capillas C, Jimenez-Colmenero F (2011) Antioxidant activity of hydroxytyrosol in frankfurters enriched with n-3 polyunsaturated fatty acids. *Food Chem* 129:429–436
- Cofrades S, Santos-Lopez JA, Freire M, Benedi J, Sanchez-Muniz FJ, Jimenez-Colmenero E (2014) Oxidative stability of meat systems made with W-1/O/W-2 emulsions prepared with hydroxytyrosol and chia oil as lipid phase. *LWT-Food Sci Technol* 59:941–947
- Cofrades S, Bou R, Flaiz L, Garcimartín A, Benedi J, Mateos R, Sánchez-Muniz FJ, Olivero-David R, Jiménez-Colmenero F (2017) Bioaccessibility of hydroxytyrosol and n-3 fatty acids as affected by the delivery system: simple, double and gelled double emulsions. *J Food Sci Technol* 54:1785–1793. doi:10.1007/s13197-017-2604-x
- Commission Regulation (EU) No 116/2010 amending Regulation (EC) No 1924/2006 of the European Parliament and of the Council with regard to the list of nutrition claims. *Off J Eur Union L37*: 16
- DeJong S, Lanari MC (2009) Extracts of olive polyphenols improve lipid stability in cooked beef and pork: contribution of individual phenolics to the antioxidant activity of the extract. *Food Chem* 116:892–897
- Dickinson E (2012) Emulsion gels: the structuring of soft solids with protein-stabilized oil droplets. *Food Hydrocoll* 28:224–241
- Flaiz L, Freire M, Cofrades S, Mateos R, Weiss J, Jiménez-Colmenero F, Bou R (2016) Comparison of simple, double and gelled double emulsions as hydroxytyrosol and n-3 fatty acid delivery systems. *Food Chem* 213:49–57
- Foegeding EA, Daubert CR, Drake MA, Essick G, Trulsson M, Vinyard CJ, Van de Velde F (2011) A comprehensive approach to understanding textural properties of semi- and soft-solid foods. *J Texture Stud* 42:103–129
- Freire M, Bou R, Cofrades S, Solas MT, Jimenez-Colmenero F (2016) Double emulsions to improve frankfurters lipid content: impact of perilla oil and pork backfat. *J Sci Food Agric* 96:900–908
- Ganhão R, Estévez M, Armenteros M, Morcuende D (2013) Mediterranean berries as inhibitors of lipid oxidation in porcine burger patties subjected to cooking and chilled storage. *J Integr Agric* 12:1982–1992
- Hur SJ, Jin SK, Kim IS (2008) Effect of extra virgin olive oil substitution for fat on quality of pork patty. *J Sci Food Agric* 88:1231–1237

- Jiménez-Colmenero F (2007) Healthier lipid formulation approaches in meat-based functional foods. Technological options for replacement of meat fats by non-meat fats. *Trends Food Sci Technol* 18(11):567–578
- Jiménez-Colmenero F (2013) Potential applications of multiple emulsions in the development of healthy and functional foods. *Food Res Int* 52:64–74
- Jiménez Colmenero F, Carballo J, Solas MT (1995) The effect of use of freeze-thawed pork on properties of bologna sausage with two fat levels. *Int J Food Sci Technol* 30:335–346
- Jiménez-Colmenero F, Salcedo-Sandoval L, Bou R, Cofrades S, Herrero AM, Ruiz-Capillas C (2015) Novel applications of oil-structuring methods as a strategy to improve the fat content of meat products. *Trends Food Sci Technol* 44:177–188
- Jo H, Kim M, Lee J, Kim H, Song Y (2013) Anti-atherogenic properties of emulsified perilla oil (EPO) in apo E KO mice and plasma lipid lowering effects of rice porridge containing EPO in healthy young adults. *Food Sci Biotechnol* 22:79–85
- Keenan DF, Resconi VC, Smyth TJ, Botinestean C, Lefranc C, Kerry JP, Hamill RM (2015) The effect of partial-fat substitutions with encapsulated and unencapsulated fish oils on the technological and eating quality of beef burgers over storage. *Meat Sci* 107:75–85
- Kountouri AM, Mylona A, Kaliora AC, Andrikopoulos NK (2007) Bioavailability of the phenolic compounds of the fruits (drupes) of *Olea europaea* (olives): impact on plasma antioxidant status in humans. *Phytomedicine* 14:659–667
- Lopez-Lopez I, Cofrades S, Yakan A, Solas MT, Jiménez Colmenero F (2010) Frozen storage characteristics of low-salt and reduced-fat beef patties as affected by Wakame addition and replacing pork backfat with olive oil-in-water emulsion. *Food Res Int* 43:1244–1254
- Lorenzo JM, Sineiro J, Amado IR, Franco D (2014) Influence of natural extracts on the shelf life of modified atmosphere-packaged pork patties. *Meat Sci* 96:526–534
- Lowder AC, Osburn W (2010) Inclusion of blended lipid solutions as functional ingredients to alter the fatty acid profile of beef patties. *J Food Sci* 75:S355–S364
- Lurueña-Martínez MA, Vivar-Quintana AM, Revilla I (2004) Effect of locust bean/xanthan gum addition and replacement of pork fat with olive oil on the quality characteristics of low-fat frankfurters. *Meat Sci* 68:383–389
- Martínez B, Miranda JM, Vázquez BI, Fente CA, Franco CM, Rodríguez JL, Cepeda A (2012) Development of a hamburger patty with healthier lipid formulation and study of its nutritional, sensory, and stability properties. *Food Bioprocess Tech* 5:200–208
- Matalanis A, Decker EA, McClements DJ (2012) Inhibition of lipid oxidation by encapsulation of emulsion droplets within hydrogel microspheres. *Food Chem* 132:766–772
- McClements DJ (2012) Advances in fabrication of emulsions with enhanced functionality using structural design principles. *Current Opin Colloid Interface Sci* 17:235–245
- Moussaoui KA, Varela P (2010) Exploring consumer product profiling techniques and their linkage to a quantitative descriptive analysis. *Food Qual Prefer* 21:1088–1099
- Poyato C, Astiasaran I, Barriuso B, Ansorena D (2015) A new polyunsaturated gelled emulsion as replacer of pork back-fat in burger patties: effect on lipid composition, oxidative stability and sensory acceptability. *LWT Food Sci Technol* 62:1069–1075
- Regulation (EC) No 1924/2006 of the European Parliament and of the Council of 20 December 2006 on nutrition and health claims made on foods. *Off J Eur Union* L404: 30
- Rodríguez-Carpena J, Morcuende D, Estévez M (2011) Partial replacement of pork back-fat by vegetable oils in burger patties: effect on oxidative stability and texture and color changes during cooking and chilled storage. *J Food Sci* 76(7):C1025–C1031
- Salcedo-Sandoval L, Cofrades S, Ruiz-Capillas C, Jimenez-Colmenero F (2014) Effect of cooking method on the fatty acid content of reduced-fat and PUFA-enriched pork patties formulated with a konjac-based oil bulking system. *Meat Sci* 98:795–803
- Salcedo-Sandoval L, Cofrades S, Ruiz-Capillas C, Carballo J, Jimenez-Colmenero F (2015) Konjac-based oil bulking system for development of improved-lipid pork patties: technological, microbiological and sensory assessment. *Meat Sci* 101:95–102
- Serrano A, Cofrades S, Jimenez-Colmenero F (2006) Characteristics of restructured beef steak with different proportions of walnut during frozen storage. *Meat Sci* 72(1):108–115

Discusión Integradora

5. DISCUSIÓN INTEGRADORA

Actualmente, diversos organismos relacionados con la salud señalan la necesidad de adecuar el contenido lipídico de la dieta a las recomendaciones nutricionales (disminución de AGS y aumento de AGP n-3). Por ello, se plantea la conveniencia de reformular los productos cárnicos a fin de obtener un perfil de ácidos grasos acorde a dichas recomendaciones. Algunas de las estrategias aplicadas implican la incorporación de aceites vegetales y marinos, puesto que su composición, rica en AGM y AGP y baja en AGS, es más saludable en comparación con la grasa animal habitualmente utilizada para la elaboración de estos. Tal incorporación se ha llevado a cabo mediante diferentes opciones tecnológicas encontrándose, entre las más comunes, su adición directa y en forma de pre-emulsión O/W (Jiménez-Colmenero, 2007; Grasso et al., 2014). Sin embargo, recientemente han surgido nuevas alternativas tecnológicas basadas en el empleo de emulsiones dobles (ED) del tipo agua-en-aceite-en-agua ($W_1/O/W_2$) y emulsiones estructuradas. Las emulsiones $W_1/O/W_2$ además de poder contener aceites con una composición lipídica saludable, ofrecen la posibilidad de encapsular compuestos bioactivos. A su vez, las emulsiones dobles estructuradas por procesos de hidrogelificación (EDG) muestran unas propiedades tecnológicas similares a la grasa animal además de presentar las características y ventajas propias de las ED. Pese a las grandes posibilidades que ofrecen estos sistemas (ED y EDG) su empleo en el desarrollo de productos cárnicos como análogos de grasa es aún muy limitado.

Con el fin de alcanzar el objetivo general planteado en la presente memoria, consistente en el **diseño y desarrollo de emulsiones dobles y emulsiones dobles estructuradas como sistema de entrega de compuestos bioactivos y su aplicación como análogos de grasa en el desarrollo de productos cárnicos funcionales**, se eligieron dos análogos distintos: una emulsión del tipo $W_1/O/W_2$ y un sistema estructurado a partir de ella. Dichos ingredientes presentan características estructurales, de composición y funcionalidad diferentes, por lo que su utilización en la reformulación de productos cárnicos provocaría cambios de distinta naturaleza, incluidos aquellos relacionados con el contenido lipídico.

En beneficio de la exposición y teniendo en cuenta los objetivos planteados, la discusión integradora se ha dividido en dos subapartados tal y como se indica en la **Figura 22**. En

primer lugar, se analizará el desarrollo de distintas ED y EDG encaminado a dotarlas de características adecuadas para ser usadas como análogos de grasa desde un punto de vista nutricional y tecnológico. Posteriormente, se estudiarán los procesos de reformulación de productos cárnicos con emulsiones dobles y emulsiones dobles estructuradas (los nuevos análogos de grasa) adicionadas y su efecto en la conservación y cocinado de estos. Con este fin se estudiarán distintas características nutricionales y tecnológicas (composición, análisis físico-químicos, estabilidad oxidativa, análisis microbiológicos, análisis sensorial) de los productos cárnicos desarrollados.



Figura 22. Esquema de la estructura con la que se aborda la discusión integradora. * El efecto del cocinado solo se ha considerado en el caso de las hamburguesas puesto que en el resto de productos cárnicos se realiza una cocción durante su elaboración.

5.1. DESARROLLO DE EMULSIONES DOBLES Y EMULSIONES DOBLES GELIFICADAS

Las emulsiones de aceite-en-agua (O/W) han sido ampliamente estudiadas como posibles ingredientes en productos cárnicos (Bloukas et al., 1997; Muguerza et al., 2001; Pelser et al., 2007; Delgado-Pando et al., 2010b; Garcia-Iniguez de Ciriano et al., 2010). No obstante, recientemente, el empleo de emulsiones de agua-en-aceite-en-agua ($W_1/O/W_2$) como estrategia de reducción de grasa y de mejora del perfil lipídico está recibiendo gran atención puesto que posibilitan la encapsulación, protección y liberación de diversos compuestos bioactivos tales como antioxidantes y AG n-3 (Jiménez-Colmenero, 2013).

En los últimos años, en nuestro grupo, se han desarrollado emulsiones de $W_1/O/W_2$ formuladas con caseinato sódico (NaCas) al 0,5% y poliglicerol del ácido polirricinoleico (PGPR) al 6% como surfactantes hidrofílico y lipofílico, respectivamente, y aceites vegetales al 30%. En base a los estudios realizados, estos sistemas mostraron una buena estabilidad, así como adecuadas propiedades tecnológicas. Su incorporación en sistemas modelos cárnicos originaron una disminución de grasa cercana al 30% y una mejora del perfil de ácidos grasos (Cofrades et al., 2013). A partir de los resultados obtenidos, se abordó su adecuación como sistemas de entrega de compuestos bioactivos. Para ello, se incorporó hidroxitirosol (HXT) en la fase acuosa interna (W_1) de una emulsión doble elaborada con aceite de chía, estudiando, entre otras propiedades, la eficiencia de encapsulación y su estabilidad. Así mismo, se procedió a evaluar el efecto de su incorporación en un sistema modelo cárnico del tipo gel/emulsión. Los hallazgos y conclusiones que se describen en el apartado 4.1.1 de la presente tesis, llevaron a plantear la conveniencia de mejorar la consistencia líquida que presentaban las diferentes emulsiones con la finalidad de obtener un análogo con propiedades sólidas similares a la grasa animal. Con tal propósito se estudiaron en cada una de las fases que componen la $W_1/O/W_2$ distintas modificaciones:

- En una primera etapa se trabajó en la fase W_1 incorporando gelatina sin que se obtuvieran cambios notables en la estructura del sistema, por lo que se desestimó esta posibilidad.
- A continuación, se procedió a modificar las características de la fase lipídica (O). Para ello, se partió de una fase lipídica esencialmente compuesta por: aceite de oliva, el emulsionante lipofílico PGPR en diferentes concentraciones (3-6%) y el ingrediente E471, constituido por mezclas en distintas proporciones de mono y di-acilglicéridos (MDAG), añadido en distintos porcentajes (3 o 6 %) capaces de promover la cristalización de esta fase. Los nombres comerciales de las mezclas de MDAG fueron Verol CRS 10 y Verol CRS 50, los cuales contienen al menos un 10 y 45 % MDAG respectivamente, **apartado 4.1.2**. El empleo de esta estrategia aumentó la viscosidad y originó un comportamiento reológico tipo gel en algunos de los casos. Sin embargo, no permitió obtener una estructura sólida a temperatura ambiente que se asemejara a la grasa animal.
- Como última estrategia, se procedió a la estructuración de la fase acuosa externa (W_2) aplicando diferentes mecanismos de gelificación. El procedimiento que presentó mejores resultados fue la gelificación de la ED con un 4% de gelatina y un 2 % transglutaminasa microbiana (TGM). De esta manera se obtuvieron emulsiones

dobles estructuradas con un 30% de aceite de perilla y una apariencia de gel similar a la grasa animal. Dichos resultados se describen en los apartados 4.1.3 y 4.1.4.

En la **Tabla 12** se incluye un cuadro resumen para un mejor seguimiento del análisis y estudio comparativo de las muestras analizadas en la presente discusión integradora. Los apartados referidos a los artículos científicos se denominarán **publicaciones**. Así mismo, a fin de evitar posibles confusiones entre distintas emulsiones elaboradas, las denominaciones de las muestras se mantienen tal cual aparecen en las diferentes publicaciones (**Tabla 12**). Con el mismo propósito, en esta sección la denominación de emulsiones dobles será **DE** y de emulsiones dobles gelificadas **GDE**, proveniente del inglés. A su vez, el hidroxitirosol que se ha sido denominado en las diferentes publicaciones como HXT, Hyt y HTy, será referido como **HXT** en la discusión integradora.

Tabla 12. Formulación de las diferentes emulsiones dobles y emulsiones dobles gelificadas estudiadas y apartados (publicaciones) donde se describen específicamente.

Muestra	Fase acuosa interna (8%)	Fase lipídica (32%)	Fase acuosa externa (60%)	Apartado (Publicaciones)
DE/C	NaCl 0,5 M NaCas 0,5%	Chía 94% PGPR 6%	NaCl 0,5 M NaCas 0,5%	4.1.1 (Cofrades et al, 2014)
DE/HXT	NaCl 0,5 M NaCas 0,5% HXT 100 mg/kg	Chía 94% PGPR 6%	NaCl 0,5 M NaCas 0,5%	4.1.1 (Cofrades et al, 2014)
DE1	NaCl 0,5 M	Oliva 94% PGPR 6%	NaCl 0,5 M NaCas 0,5%	4.1.2 (Fernández-Martin, et al 2017)
DE10	NaCl 0,5 M	Oliva 81% PGPR 6% Verol 50 6%	NaCl 0,5 M NaCas 0,5%	4.1.2 (Fernández-Martin, et al 2017)
DE/HTy-PO	NaCl 0,5 M HXT 375 mg/kg	Perilla 94% PGPR 6%	NaCl 0,5 M NaCas 0,5%	4.1.3 (Flaiz et al, 2016)
GDE/HTy-PO	NaCl 0,5 M HXT 375 mg/kg	Perilla 94% PGPR 6%	NaCl 0,5 M NaCas 0,5% Gelatina 4% TGM 2%	4.1.3 (Flaiz et al, 2016)
DE-C	NaCl 0,5 M	Perilla 94% PGPR 6%	NaCl 0,5 M NaCas 0,5%	4.1.4 (Freire et al 2017)
DE-Hyt	NaCl 0,5 M HXT 125 mg/kg	Perilla 94% PGPR 6%	NaCl 0,5 M NaCas 0,5%	4.1.4. (Freire et al 2017)
GDE-C	NaCl 0,5 M	Perilla 94% PGPR 6%	NaCl 0,5 M NaCas 0,5% Gelatina 4% TGM 2%	4.1.4 (Freire et al 2017)
GDE-Hyt	NaCl 0,5 M HXT 125 mg/kg	Perilla 94% PGPR 6%	NaCl 0,5 M NaCas 0,5% Gelatina 4% TGM 2%	4.1.4 (Freire et al 2017)

NaCas: caseinato sódico, HXT: hidroxitirosol, PGPR: poliglicerol del ácido polirricinoleico, NaCl: cloruro sódico, TGM: transglutaminasa microbiana

5.1.1. Estudio nutricional de los análogos desarrollados

Las emulsiones se formularon con la finalidad de obtener un ingrediente para su incorporación en productos cárnicos. Por tanto, es imprescindible conocer su composición para valorar su contribución nutricional en el producto elaborado.

La **composición** de dichos sistemas se ha estimado de acuerdo a su formulación (**Tabla 13**). El contenido proteico de las emulsiones dobles (DE) fue de aproximadamente de un 0,3%, procedente del emulsionante hidrofílico (NaCas); mientras que las GDE presentaron una concentración de proteína del 4,3 %, debido, además del NaCas, a la gelatina utilizada en el proceso de gelificación. Se ha descrito que tanto la gelatina como el NaCas presentan efectos limitantes de la oxidación, al ejercer un efecto inhibitor sobre radicales libres (Dwyer et al., 2012; Matalanis et al., 2012; Sato et al., 2014). El contenido de agua en todos los sistemas fue del 68% (**Tabla 13**).

Tabla 13. Composición de las diferentes emulsiones dobles y emulsiones dobles gelificadas.

	Proteína %	Agua %	Lípidos %	AGS %	AGM %	AGP %	AGP /AGS	n-6/ n-3	HXT mg/kg
DE1	0,3	68,0	30,0	4,5	22,1	3,0	0,67	-	-
DE10	0,3	68%	28,0	4,1	20	2,7	0,67	-	-
DE/C	0,3	68,0	30,0	3,0	2,2	24,3	8,1	0,3	-
DE/HTX	0,3	68,0	30,0	3,0	2,2	24,3	8,1	0,3	100
DE-C	0,3	68,0	30,0	3,6	5,5	21,0	5,9	0,3	-
DE-Hyt	0,3	68,0	30,0	3,6	5,5	21,0	5,9	0,3	100
DE/HTy-PO	0,3	68,0	30,0	3,6	5,5	21,0	5,9	0,3	300
GDE-C	4,3	68,0	30,0	3,6	5,5	21,0	5,9	0,3	-
GDE-Hyt	4,3	68,0	30,0	3,6	5,5	21,0	5,9	0,3	100
GDE/HTy-PO	4,3	68,0	30,0	3,6	5,5	21,0	5,9	0,3	300

AGS, ácidos grasos saturados; AGM, ácidos grasos monoinsaturados, AGP, ácidos grasos poliinsaturados, HXT: hidroxitirosol

En relación al contenido lipídico, todas las emulsiones, independientemente de si sufrieron o no un proceso de gelificación, estaban constituidas por un 32% de fase lipídica, la cual estaba formada, generalmente, por un 30% de aceite vegetal (**Tabla 13**). En base a tales consideraciones, todas las emulsiones contenían porcentajes de AGS inferiores al 5% (**Tabla 13**). Así mismo, las DE que estaban elaboradas con aceite de oliva (DE1 y DE10) presentaban altos valores de AGM, atribuido al elevado contenido en oleico que presenta dicho aceite (**Figura 23**), mientras que las emulsiones elaboradas con aceites de chía o perilla, mostraron valores elevados de AGP, asociado al alto contenido en α -linolénico (ALA) en los mismos.

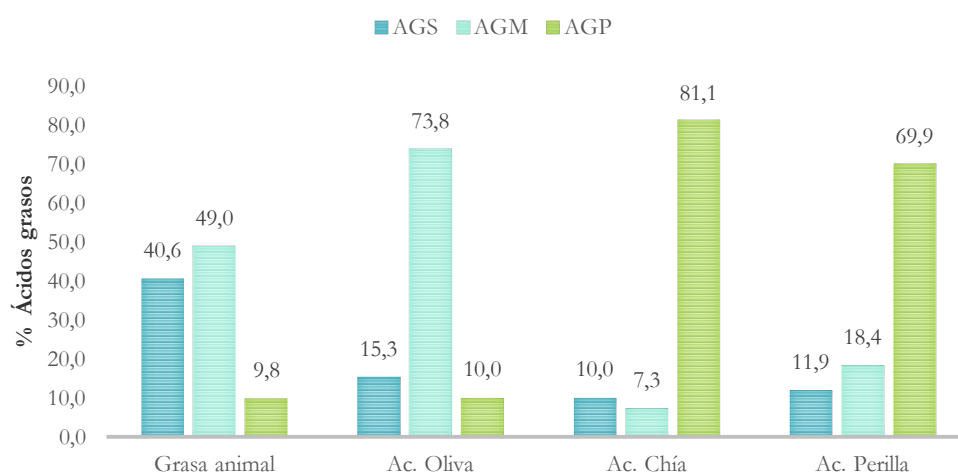


Figura 23. Perfil general de los ácidos grasos (%) presentes en los aceites (Ac) empleados en la elaboración de emulsiones y su comparación con el exhibido por la grasa animal. (Dubois et al., 2007; BEDCA, 2010).

La **relación AGP/AGS** constituye uno de los principales parámetros empleados para evaluar la calidad nutricional de la fracción lipídica de los alimentos. Las recomendaciones establecidas al respecto indican que valores mayores a 0,4 determinan una buena calidad de la grasa en el producto (Wood et al., 2004). Los sistemas elaborados con aceite de chía y perilla presentaron una relación de AGP/AGS mayor de 0,4 (8,1 y 5,9 en el aceite de chía y perilla respectivamente). La **relación $n-6/n-3$** está asociada con la patogénesis de muchas enfermedades entre las que se encuentran las ECV, por lo que para reducir el riesgo de estas últimas se recomienda que dicho índice sea menor a 4. En este sentido, cabe destacar que

ambos sistemas presentaron una ratio de 0,3, claramente por debajo de las recomendaciones actuales (**Tabla 13**).

Por todo lo anteriormente expuesto, en base al contenido lipídico de los aceites vegetales (**Figura 23**) que se emplearon para la elaboración de las DE y las GDE, se puede establecer que todos los sistemas presentan un perfil lipídico que posibilita la elaboración de productos cárnicos más acordes con las recomendaciones actuales de salud.

Además, es bien conocido que estos sistemas pueden vehiculizar compuestos bioactivos tanto hidrofóbicos como hidrófilos. Las emulsiones dobles y dobles gelificadas desarrolladas en la presente tesis se han diseñado para encapsular hidroxitirosol (HXT), obteniéndose sistemas con una concentración de 100 y 300 mg/kg de dicho compuesto (**Tabla 13**). Cabe mencionar que este biocompuesto puede disminuir su concentración a lo largo de la conservación de las emulsiones elaboradas (descrito más adelante), con potenciales repercusiones a nivel nutricional y tecnológico. A nivel nutricional permitiría su liberación y su absorción en el organismo, dotando a los productos cárnicos de potenciales efectos funcionales (Pazos et al., 2008; Cofrades et al., 2011a). Mientras que a nivel tecnológico actuaría como antioxidante retardando y protegiendo a los AG insaturados de los procesos oxidativos.

5.1.2. Aspectos tecnológicos de los análogos de grasa

El estudio físico-químico de las emulsiones dobles y dobles gelificadas es necesario para entender su papel como ingrediente en la elaboración de productos cárnicos. En tal sentido, en la presente memoria dicho estudio se aborda a dos niveles, uno relativo a sus características iniciales asociadas a los procesos de formulación y otro relativo a los cambios originados en las etapas de conservación, habitualmente empleadas en los ingredientes cárnicos y no cárnicos implicados en la elaboración de dichos productos. En este caso por razones económicas, de organización de tareas de producción, de seguridad, etc., estos análogos requieren de periodos de conservación más bien cortos. Por tanto, el estudio de estos ingredientes se llevó a cabo al inicio (recién elaborados) y tras varios días de conservación en refrigeración a 4 °C.

Los sistemas desarrollados en la actual tesis tienen distintas características. De especial relevancia es el hecho de que las ED presentaron un estado líquido a temperatura ambiente

(Figura 24). Este comportamiento fue modificado mediante el proceso de gelificación, inducido por gelatina y TGM en la fase acuosa externa (W_2) hasta obtener una GDE con consistencia similar a la de la grasa animal (Figura 24).



Figura 24. Ejemplos de grasa animal, así como de emulsión doble (DE) y emulsión doble gelificada (GDE).

5.1.2.1. Consecuencia del proceso de formulación

El análisis **morfológico** realizado mediante microscopia óptica evidenció que todas las muestras exhibían la compartimentalización típica de las emulsiones dobles, con pequeñas gotitas de la W_1 dispersas en la fase oleosa (O) que a su vez estaba contenida en la fase acuosa (W_2) (**Figura 25, DE1**). No se observaron diferencias en la morfología de las emulsiones dobles ni por efecto del tipo de aceite (rico en AGM o en AGP, n-3), ni por la incorporación de mono y di-acilglicéridos (MDAG) en la fase lipídica (O) (**Figura 25, DE10**), ni por la encapsulación de HXT en la W_1 (**Figura 25, DE-HTy-PO**). Las GDE presentaron una clara diferencia en la estructura de la fase acuosa externa respecto a las demás emulsiones (**Figura 25, GDE-HTy-PO**), presentando una fase continua gelificada con partículas (W_1/O) atrapadas en su interior y estabilizadas por diversos tipos de interacciones, quedando embebidas en una red compleja. A pesar de ello, también presentaban la estructura típica de la emulsión doble (Publicación 4.1.3).

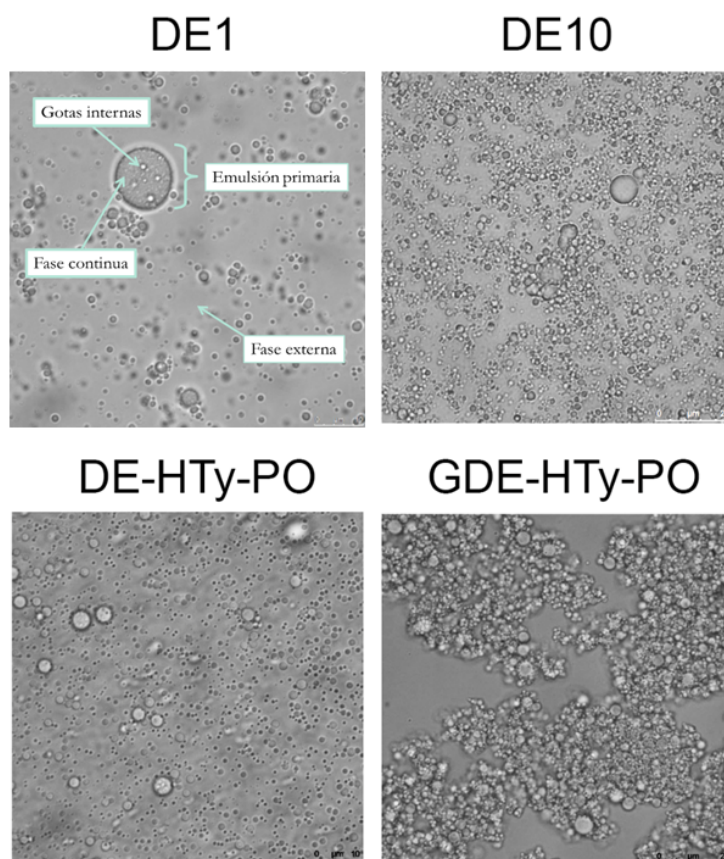


Figura 25. Ejemplos de imágenes de microscopía óptica de emulsiones dobles (DE1, DE10 y DE-HTy-PO) y emulsión doble gelificada (GDE-HTy-PO). DE1: DE con 6%PGPR; DE10: DE con 6%PGPR+6% Verol50; DE-HTy PO: DE gelificada y GDE-HTy-PO: DE gelificada y con hidroxitirosol encapsulado en la W_1 . Adaptado de las Publicaciones 4.1.2 y 4.1.4.

El análisis de la **distribución y tamaño de partícula** indicó que la DE elaborada con chía y con HXT (DE/HXT) mostró un comportamiento bimodal, mientras que todas las demás exhibieron una distribución monomodal (**Figura 26**), incluida la DE-HTy (elaborada con aceite de perilla, **Tabla 12**). Tal comportamiento está en consonancia con lo descrito por otros autores que usaban PGPR y NaCas como emulsionantes (Frasch-Melnik et al., 2010; Cofrades et al., 2013; Bou et al., 2014).

La muestra DE1, preparada con aceite de oliva, mostró un rango (0,8-10 μm) similar al de las emulsiones que contenían aceite de chía (0,5 a 10-20 μm) (DE/C) y de perilla (0,58- 9 μm) (DE-C). No obstante, la presencia de HXT encapsulado en la W_1 afectó a la distribución del tamaño de partícula, tanto en las emulsiones elaboradas con chía (0-20 y 20-100 μm) (DE/HXT), como con perilla (0,47-18 μm) (DE-HTy), presentando un rango mayor que en las DE que no lo contenían (Publicaciones 4.1.1 y 4.1.2).

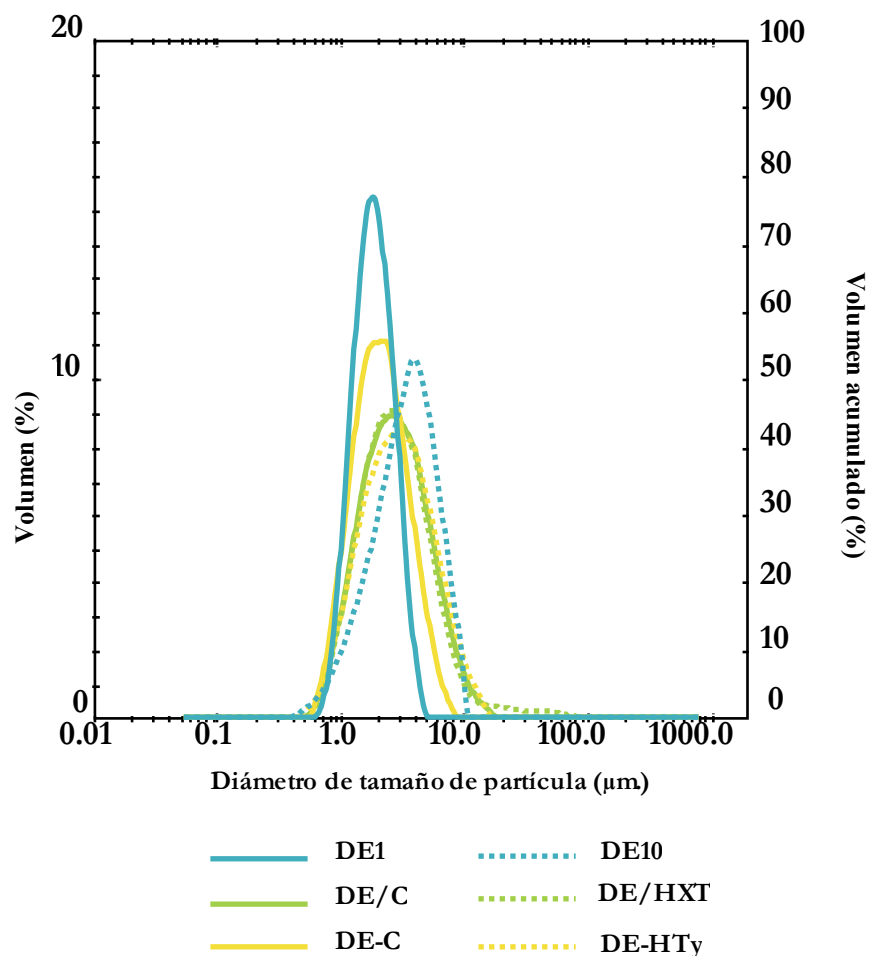


Figura 26. Distribución de tamaño de partícula (inicial) de las emulsiones dobles. Adaptado de las Publicaciones 4.3.1, 4.3.3, y 4.1.1. Para ver composición de las emulsiones visualizar la Tabla 12.

Como se ha mencionado anteriormente, una de las posibilidades de las DE y GDE es la encapsulación de compuesto bioactivos en la W_1 . En este sentido se ha encapsulado 300 mg/kg de HXT en una emulsión doble y doble gelificada elaboradas con aceite de perilla (DE-HTy-PO y GDE-HTy-PO, Publicación 4.1.3). El proceso de elaboración no afectó a la **concentración de HXT**, siendo la cantidad encontrada en las muestras tras su elaboración de 298 mg/kg en DE- HTy-PO y de 292 mg/kg en GDE-HTy-PO. De acuerdo con estos datos, el rendimiento fue de 99,5%, similar a los resultados obtenidos con otros componentes, como por ejemplo el trans-resveratrol (95-98%) (Matos et al., 2014). Cabe destacar que la **eficiencia de encapsulación** (EE) fue del 55% en las DE-HTy-PO. Estos resultados difieren a los hallados en DE elaboradas por Matos et al. (2014) y Aditya et al. (2015) al encapsular trans-resveratrol (20-40%) y catequina (97%), respectivamente. Sin embargo, cabe señalar que la EE depende de varios factores incluyendo la composición de las DE y la tecnología usada para su elaboración, así como de la naturaleza del compuesto

encapsulado (Dickinson, 2011). Aunque la formación de la GDE dificulta la determinación de la EE, es razonable pensar que su eficiencia sea similar a la mostrada por la DE (DE-HTy-PO).

La **estabilidad** en las emulsiones es un factor de gran importancia ya que ayudará a determinar la idoneidad de estos análogos de grasa como ingredientes en productos cárnicos. El proceso de formulación de las emulsiones dobles no afectó a su **estabilidad gravitacional**, presentando valores cercanos al 100% (sin separación de fase) como se observa en la **Figura 27a**. Este comportamiento no estuvo condicionado por efecto de la formulación: incorporación de HXT en la W_1 o de MADG en la fase lipídica (O) (Publicaciones 4.1.1 y 4.1.2, **Tabla 3**). El proceso de gelificación tampoco condicionó la estabilidad de las emulsiones (Publicación 4.1.4), obteniéndose geles fuertes (**Figura 27b**). Como la mayoría de los productos cárnicos se someten a algún tipo de proceso de calentamiento durante su producción o preparación doméstica, se debe considerar estudiar la **estabilidad térmica** de los análogos de grasa, como por ejemplo de la GDE. Independientemente de la formulación, no se produjeron pérdidas del fluido durante el tratamiento térmico, indicativo de una adecuada estabilidad.

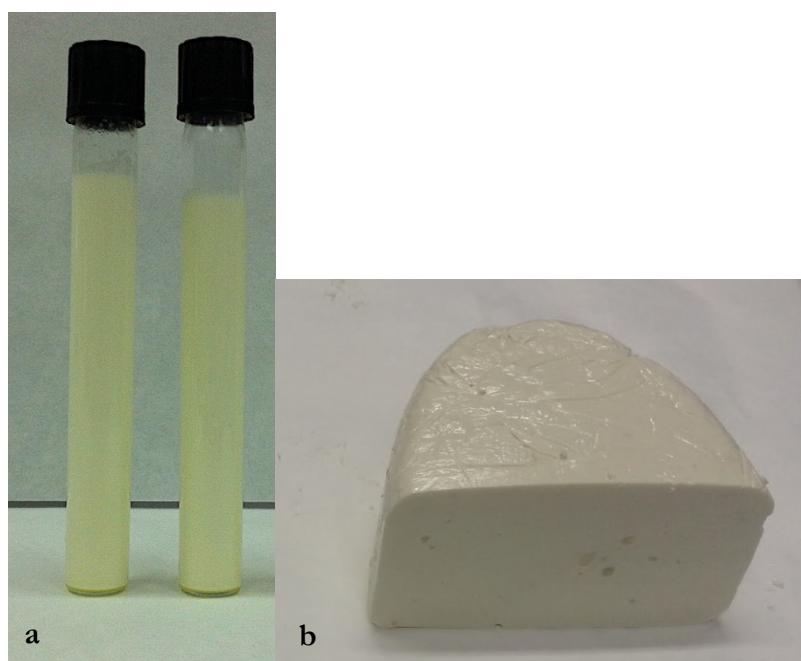


Figura 27. Estabilidad gravitacional de las emulsiones dobles (a) y emulsiones dobles gelificadas (b) tras el proceso de elaboración.

El **color** es una característica importante en el desarrollo de estos análogos de grasa, ya que influirá en la apariencia del producto final, siendo uno de los atributos que determina la aceptabilidad general del mismo. Es evidente que los componentes empleados en su elaboración, así como las condiciones de preparación y el estado de oxidación pueden contribuir al color final. Como se puede observar en las **Figuras 24 y 27**, tanto las DE como las GDE presentaron una coloración blanquecina/amarillenta muy parecida a la grasa de cerdo. La gelificación ejerció efecto ($p < 0,05$) sobre el color (Publicación **4.1.3**), disminuyendo los valores de tendencia al rojo (a^*). Este cambio se puede asociar a la presencia de gelatina y TGM que presentan un color más blanquecino, estos resultados se encuentran en consonancia con los observados por otros autores (Pintado et al., 2015b). A su vez, el HXT también condicionó ($p < 0,05$) este atributo (Publicación **4.1.4**), ya que las muestras que lo contenían (GDE-Hyt) presentaron valores más altos en tendencia al rojo y más bajos en luminosidad (L^*) y tendencia al amarillo (b^*) que los geles sin el biocompuesto encapsulado (GDE-C). Este comportamiento cabe atribuirlo a la migración del HXT encapsulado en la W_1 hacia la fase externa gelificada; ya que, debido a su coeficiente de partición, es también parcialmente soluble en la fase lipídica.

Las propiedades texturales de estos sistemas proporcionan información útil sobre su naturaleza, y también sobre su posible influencia en las características de los productos en los que pueden añadirse. Las **características de textura y reología** de las DE y GDE fueron analizadas mediante distintos ensayos en función de la naturaleza de cada sistema. El **análisis reológico** (descrito en las Publicaciones **4.1.2 y 4.1.4**), se realizó evaluando el espectro mecánico (comportamiento tanto del módulo viscoso; G'' , como del módulo elástico; G' frente a la frecuencia) dentro del rango viscoelástico lineal. Las muestras DE1 y DE10 (Publicación **4.1.2**), que estaban constituidas por aceite de oliva, 6% de PGPR y distintas concentraciones de MDAG 0 y 6% de Verol 50 en su fase lipídica, respectivamente, mostraron un comportamiento típico de fluido viscoso (**Figura 28**). Al observar el punto de cruce entre G' y G'' a distintas frecuencias en función de la composición, estas DE revelaron que a bajas frecuencias existía un predominio del comportamiento viscoso ($G'' > G'$), mientras que a altas frecuencias predomina un comportamiento elástico ($G' > G''$). La muestra DE1, que no contenía MDAG, mostró el entrecruzamiento entre los módulos elástico y viscoso a valores inferiores a 1 Hz, con una fuerte dependencia de la frecuencia, mientras la muestra DE10, que presentaba un 6% de MDAG Verol 50, el entrecruzamiento se observó a valores cercanos a 7 Hz, apreciándose una menor dependencia de la frecuencia. Por tanto, la DE1 muestra el comportamiento de una emulsión típica (dependiente de la

frecuencia), mientras que las DE10 a pesar de presentar un estado líquido, reveló un cierto comportamiento de gel, asociado al aumento de la viscosidad de la fase lipídica por la presencia de fenómenos de cristalización originados por la adición de MDAG.

Por otro lado, el proceso de gelificación produjo cambios importantes en el comportamiento reológico de las DE (GDE-C y GDE-Hyt, Publicación 4.1.4). Ambas muestras exhibieron un comportamiento predominantemente elástico ($G' > G''$), con apenas dependencia de la frecuencia, característico de los geles con una fuerte estructura. Dicho comportamiento se confirma con valores bajos (< 4) del ángulo de fase (δ°). No obstante, en la GDE que contenía HXT (GDE-Hyt) su presencia afectó a las características del gel, siendo este más débil que la muestra control (resultados descritos más adelante).

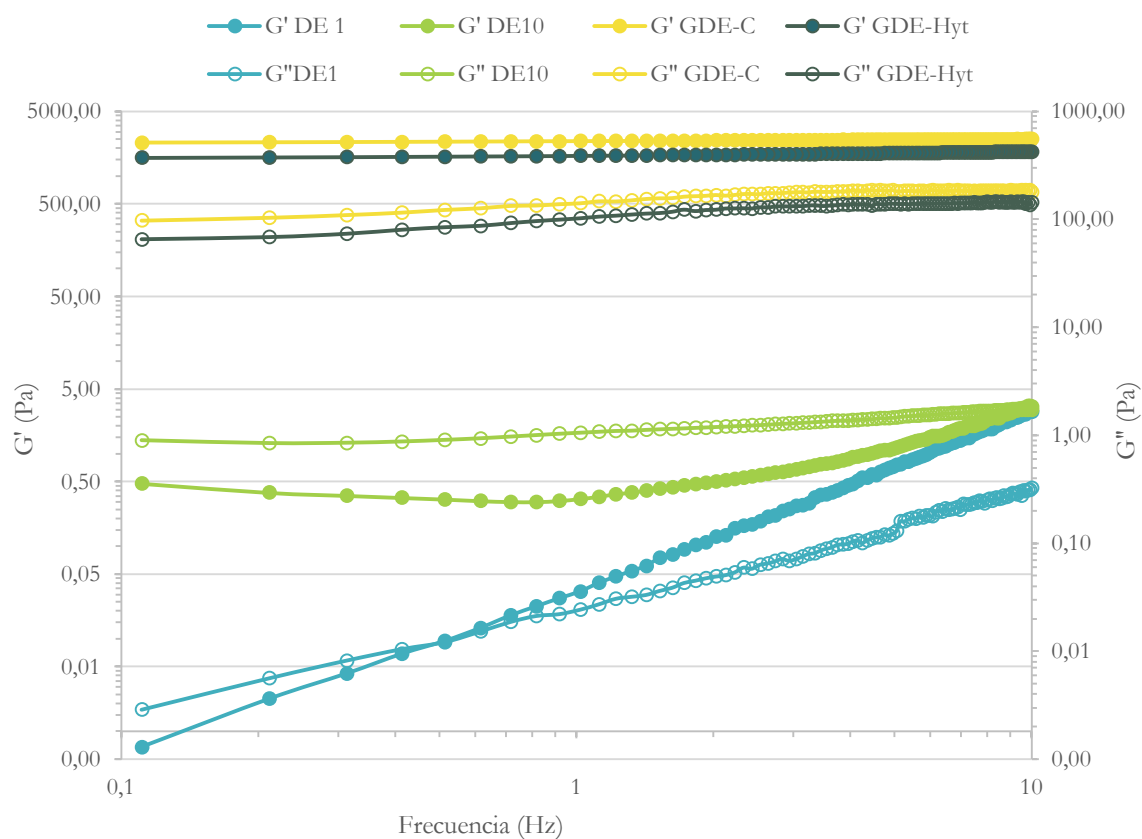


Figura 28. Comportamiento reológico de las emulsiones dobles (DE) DE1 y DE10 y emulsiones dobles gelificadas (GDE) GDE-C y GDE-Hyt. DE1: DE con 6%PGPR; DE10: DE con 6%PGPR+6% Verol50; GDE-C: DE gelificada y GDE-Hyt: DE gelificada con hidroxitirosol encapsulado en la W₁. Adaptado de las Publicaciones 4.1.2 y 4.1.4.

El δ° estuvo condicionado por efecto de la formulación, observándose que la DE1 y DE10 (0 y 6% de MDAG en la fase lipídica respectivamente) presentaron valores altos de δ° (60-80°), indicativo del carácter predominantemente viscoso de las emulsiones (**Figura 29**). Sin embargo, la presencia del 6% de MDAG en la fase lipídica (DE10) originó un pico en el δ° a $\sim 1\text{Hz}$ que podría sugerir la presencia de algún tipo de cambio conformacional como una transición vítrea (presumiblemente por la formación de cristales), comportamiento corroborado con los estudios de **calorimetría diferencial de barrido (DSC)**. Por otra parte, en las muestras gelificadas (GDE-C y GDE-Hyt) se observaron valores de $\delta^\circ < 4$, indicativo de una estructura de gel fuerte. Valores cercanos a 90° son típicos de un material líquido, mientras que los próximos a 0 son propios de un material elástico (gel verdadero).

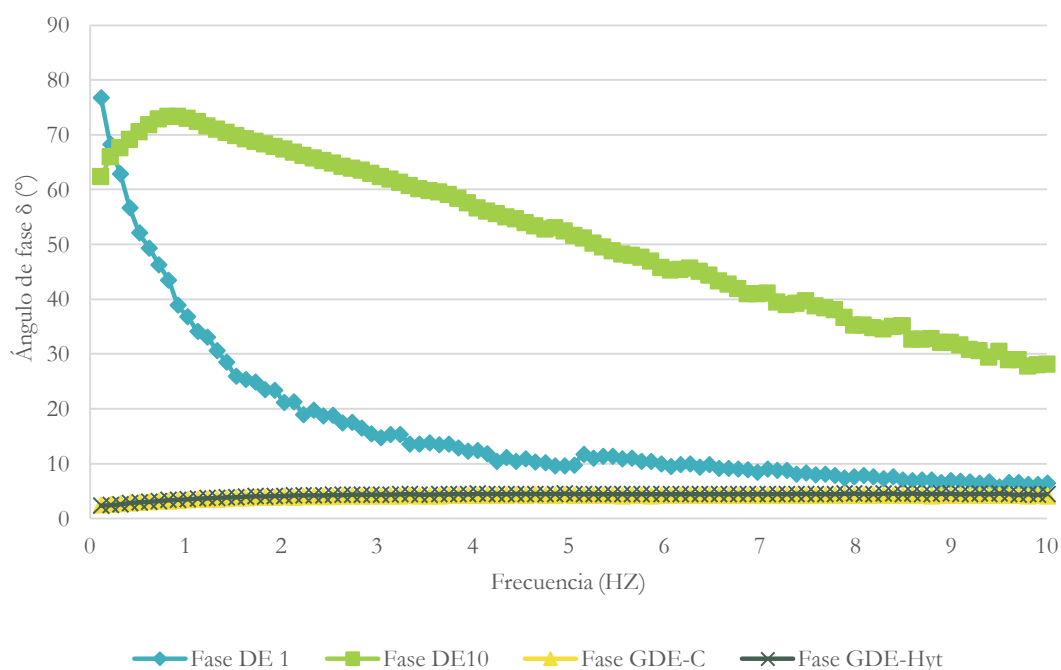


Figura 29. Comportamiento del ángulo de fase (δ°) de las emulsiones dobles (DE) DE1 y DE10 y emulsiones dobles gelificadas (GDE) GDE-C y GDE-Hyt. DE1: DE con 6%PGPR; DE10: DE6% PGPR+6%Verol50; GDE-C: DE gelificada y GDE-Hyt: DE gelificada con HXT encapsulado en la W_1 . Adaptado de las Publicaciones 4.3.1 y 4.3.3.

Debido a las características intrínsecas (consistencia) de las DE solo se pudo analizar la textura mediante el ensayo de TPA en las GDE (Publicación 4.1.4, **Tabla 1**). Los parámetros de textura se vieron afectados por la formulación, presentando la muestra con HXT en la W_1 (GDE-Hyt) una disminución significativa de la dureza con respecto al control (GDE-C), confirmando la disminución de G' y G'' ya descrita. Tal comportamiento puede atribuirse a

que los geles con HXT presentaban una mayor distribución y tamaño de partícula, lo que conlleva a estructuras menos viscosas y rígidas debido a la menor probabilidad de interacciones partícula-partícula (Bou et al., 2014). También se puede deber a que el HXT, aunque débil, tiene una cierta afinidad por las proteínas alimentarias típicas incluyendo el NaCas y la gelatina. Así pues, al ser un compuesto fenólico puede interferir ligeramente en las interacciones moleculares (proteína-proteína en la fase externa) durante el proceso de gelificación en frío, induciendo una estructura de gel menos rígida.

Debido a utilización de aceites de origen vegetal, ricos en AGM y AGP, en la elaboración de las distintas emulsiones estudiadas como sustitutos de grasa, se hace necesario evaluar si su mayor grado de insaturación condiciona a una mayor susceptibilidad a la **oxidación lipídica**. Entre otros factores, el estado de oxidación de las muestras vendrá determinado por el proceso de elaboración y por aquellos aspectos cuantitativos y cualitativos de las materias primas empleadas. El proceso de formulación condicionó ($p < 0,05$) la oxidación, evaluada por medio de los valores de TBARS, de las DE elaboradas con aceite de chía (DE/C y DE/HXT, **4.1.1**). En general, los resultados obtenidos indican la existencia de ciertos procesos oxidativos que se pueden atribuir principalmente a las condiciones de preparación de las DE (calentamiento a 60 °C de la fase lipídica, así como aplicación de presión elevada) y a la alta susceptibilidad hacia la oxidación de los ácidos grasos de la serie n-3 del aceite de chía. De acuerdo con estos resultados, Poyato et al. (2013) también indican que la preparación de DE puede producir una leve oxidación lipídica, lo cual sugiere la conveniencia de proteger la fase lipídica con antioxidantes. Sin embargo, el proceso de gelificación no afectó a las GDE elaboradas con aceite de perilla rico en AGP n-3 (GDE-C y GDE-Hyt, Publicación **4.1.4**), ya que apenas se observaron signos de oxidación. Dado que el proceso de gelificación (40 °C en agitación durante un periodo de tiempo relativamente largo, 30 min) se produce después de la elaboración de la DE, esta diferencia en los valores de oxidación se puede atribuir a diversos factores como el tipo de aceite vegetal utilizado (chía y perilla), la presencia de compuestos antioxidantes y el estado oxidativo del aceite empleado. Estos resultados están en consonancia con los obtenidos al comparar el comportamiento oxidativo de diversos sistemas de liberación controlada (emulsión simple, emulsión doble y emulsión doble gelificada) que contenían HXT (Publicación **4.1.3**).

La presencia de HXT evidenció un efecto antioxidante ($p < 0,05$) en la DE. El sistema que contenía HXT (DE/HXT, **4.1.1**) mostró menores niveles de oxidación que la muestra sin el biocompuesto (DE/C, **4.1.1**). Dicho efecto se puede observar en el recuadro punteado de la

Figura 30, dónde las variaciones relativas en los niveles de oxidación de las muestras son comparadas frente a sus valores de referencia (controles). Así, los valores de TBARS en la DE/HXT fueron aproximadamente un 30% inferiores frente a su muestra control. Este comportamiento protector puede atribuirse primeramente a la localización del HXT en la W_1 , que le permite entrar en contacto con el aceite de chía en la interface O/ W_1 y por otro lado, a su relativa solubilidad en lípidos pudiendo inhibir su oxidación durante la elaboración de la emulsión. Este mismo efecto no se ha podido contemplar en la emulsión doble gelificada elaborada con perilla y con HXT (GDE-Hyt Publicación 4.1.4), ya que este sistema apenas presentó oxidación.

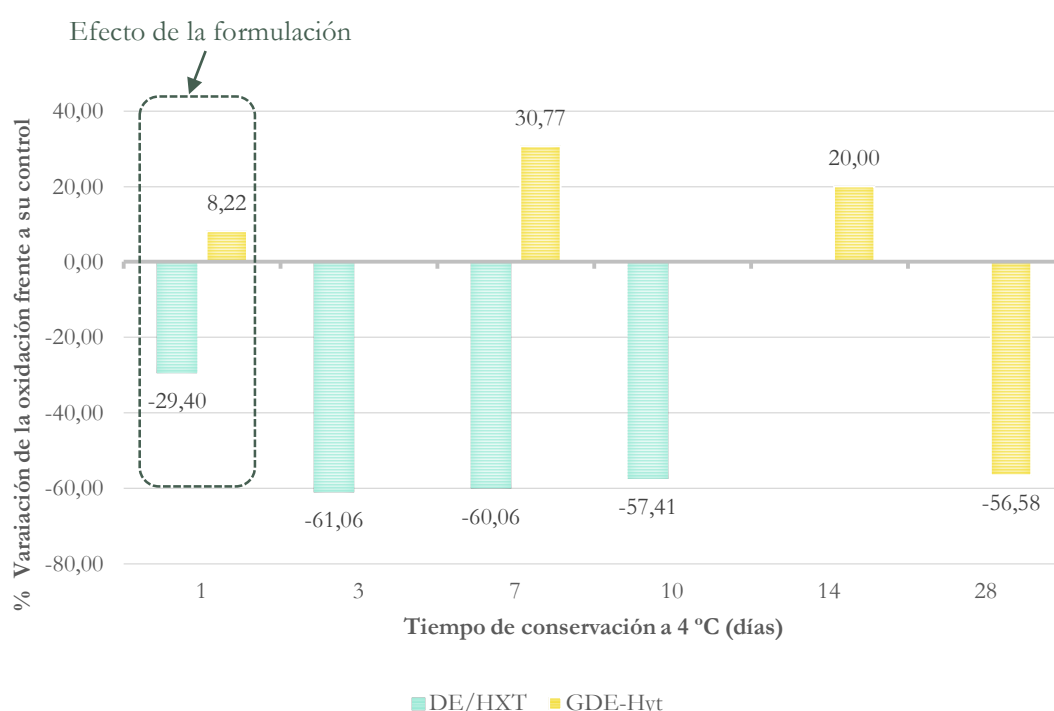


Figura 30. % Variación de la oxidación lipídica (TBARS) de las emulsiones doble (DE)s y emulsiones dobles gelificadas (GDE) con hidroxitirosol (HXT)) (DE/HTX y GDE-HTy) frente a sus respectivos controles (DE/C y GDE-C). DE/HXT: emulsión doble con 100 mg/kg de hidroxitirosol; GDE-Hyt: emulsión doble gelificada con 100 mg/kg de hidroxitirosol. % Variación calculado fijando las muestras controles como 100% en cada caso. Adaptado de las Publicaciones 4.3.3 y 4.1.1.

La **capacidad antioxidante** se relaciona habitualmente con la presencia de compuestos, entre ellos fenólicos, que pueden retrasar o inhibir la oxidación de otra molécula (Prior et al., 2005; Perez-Jiménez et al., 2008). Dicha capacidad estuvo condicionada ($p < 0,05$) por el efecto de la formulación (presencia de HXT) tanto en las DE elaboradas con aceite de chía (DE/C y DE/HXT, 4.1.1), como en los geles formulados con perilla (GDE-Hyt y GDE-C, Publicación 4.1.4). Las muestras que contenían HXT presentaron mayor capacidad

antioxidante que las muestras sin el biocompuesto. Esto se corroboró al observar los valores relativos de la capacidad antioxidante respecto a su control sin HXT (recuadro punteado, **Figura 31**). Cabe destacar que, aunque ambas formulaciones (DE/HXT y GDE-Hyt) incrementaron manifiestamente la capacidad antioxidante, la muestra de GDE-Hyt presentó un incremento de un 1200% respecto a su control. Estos resultados se explican, entre otras razones, por la excelente capacidad del biocompuesto para actuar como un secuestrador de radicales libres a través de la donación de átomos de H (Leopoldini et al., 2011). Adicionalmente, en el caso de las GDE este comportamiento (mayor capacidad antioxidante) puede atribuirse al contenido proteico, puesto que se ha demostrado que tanto el NaCas, como la gelatina exhiben actividad antioxidante (Elias et al., 2008).

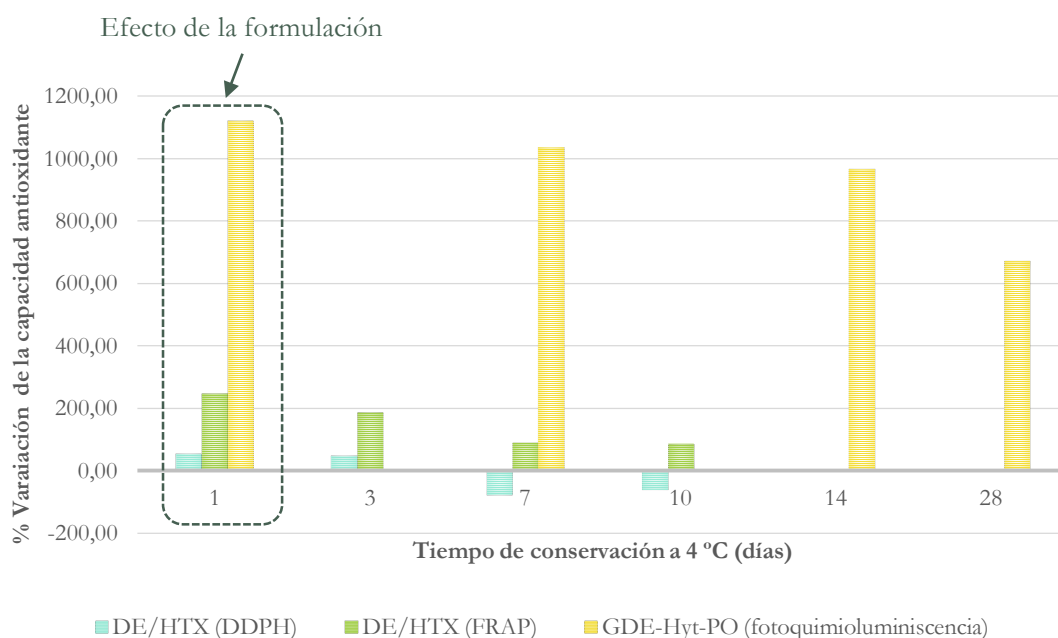


Figura 31. % variación de la capacidad antioxidante de las emulsiones dobles (DE) y emulsiones dobles gelificadas (GDE) con hidroxitirosol (HXT) (DE/HTX y GDE-HTy) respecto a su control (DE/C y GDE-C). DE/HXT: emulsión doble con 100 mg/kg de hidroxitirosol; GDE-HTy-PO: emulsión doble gelificada con 100 mg/kg de hidroxitirosol. % Variación calculado fijando las muestras controles como 100% en cada caso. Adaptado de las Publicaciones 4.3.3 y 4.1.1.

Los **aspectos microbiológicos** son también fundamentales para poder determinar la aplicación de estos sistemas como ingredientes alimentarios en los procesos de reformulación de alimentos cárnicos funcionales. Los recuentos microbianos de las GDE (Publicación 4.1.4, Tabla 5) fueron relativamente bajos tras su preparación ($< 10^{-2}$) y por tanto de acuerdo con las buenas prácticas de fabricación. Cabe mencionar que con respecto a su control homólogo (GDE-C), la presencia de HXT causó ($p < 0,05$) una reducción inicial de

aerobios totales en casi una unidad logarítmica en la muestra que lo contenía (GDE-Hyt). Hasta donde nosotros sabemos el efecto antimicrobiano del HXT aún no ha sido obtenido en DEG, si bien sí ha sido descrito en varios sistemas modelo (Medina-Martínez et al., 2016). En los que se demostró que la actividad antimicrobiana procedente del HXT, era dependiente de varios factores tales como: tipo de nutriente, riqueza de los medios de cultivo, tipo de cepas y concentración de HXT.

5.1.2.2. Efecto de la conservación

Las emulsiones desarrolladas al igual que otros ingredientes perecederos utilizados en la formulación de productos cárnicos, necesitan conservarse en refrigeración durante un cierto periodo de tiempo. Por tanto, es importante estudiar el efecto de la conservación para poder ayudar a establecer las condiciones de uso que determinarán la calidad de los productos.

El proceso de conservación no condicionó la **morfología** de las emulsiones dobles, manteniendo la estructura compartimentalizada característica de la DE (Publicación 4.1.3). Sin embargo, la **distribución y el tamaño de partícula** de las DE se vieron afectados por la conservación. En tal sentido, el sistema elaborado con aceite de oliva, 6% PGPR y 6% de MDAG en la fase lipídica (DE10, Publicación 4.1.2.), presentó un ensanchamiento, atribuido a fenómenos de inestabilidad como la maduración de Oswald y la agregación de partículas. Por otro lado, la emulsión elaborada con aceite de chía (DE/C, 4.1.1) mostró una distribución monomodal al inicio que se transformó en bimodal durante su conservación. En el caso de la muestra elaborada con chía e HXT (DE/HTX, 4.1.1) que inicialmente reveló un carácter bimodal, este efecto se mostró más acusado, relacionándose con un incremento del tamaño de partícula de la gota de aceite.

Así mismo, la conservación también ejerció efecto ($p < 0,05$) sobre la **concentración de HXT** en los sistemas DE-HTy-PO y GDE-HTy-PO (Publicación 4.1.3). Al inicio de la conservación se produjo una disminución más acusada ($p < 0,05$) en la GDE (17,68%) que en la DE (10,28%), que podría ser atribuida entre otras causas, al proceso mismo de gelificación que conlleva a la aplicación de temperatura, mezclado, así como disolución de gelatina y TGM. Sin embargo, a medida que avanzó la conservación (a partir del día 15) se originó una menor disminución de la concentración de HXT en la GDE, debido posiblemente a que la estructura de gel minimiza la pérdida de HXT durante el almacenamiento. Puesto que el HXT es altamente soluble en agua, y parcialmente en aceite,

debido a su coeficiente de partición ($K_p = 0.01$) (Rodis et al., 2002), parece plausible que este migre desde la fase interna a la acuosa externa a través de la fase lipídica durante el almacenamiento, sin implicación de los mecanismos de coalescencia y rotura. La migración sería más evidente en las DE-HTy-PO. Tal comportamiento cabe atribuirlo a varios mecanismos entre ellos a la estabilidad física de la emulsión gel, que limita la difusión de HXT a la fase externa y la inmovilización de los compuestos prooxidantes tales como los metales de transición. Sorprendentemente la **estabilidad de la encapsulación** durante la conservación en las DE (DE-HTy-PO) aumentó del 55 al 72%. Este hecho se debe a que, por un lado, para su determinación se tiene en cuenta todo el HXT del sistema en cada periodo de conservación y, por otro lado, se ha observado que el contenido de HXT en la W_1/O se mantiene constante (168-149 mg/kg). Así pues, tal aumento cabría atribuirlo a la existencia de una cierta pérdida del HXT localizado en la fase externa.

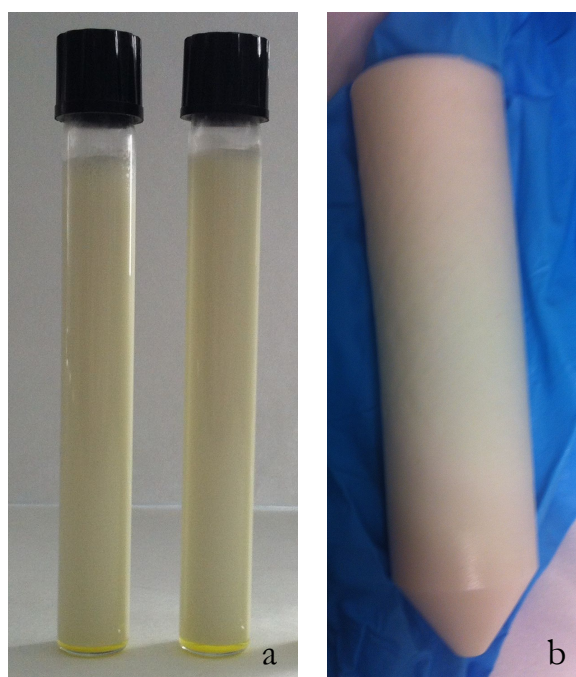


Figura32. Estabilidad gravitacional de las emulsiones dobles (a) tras un periodo de conservación de 8 días a 4 °C y emulsiones dobles gelificadas (b) al finalizar el periodo de conservación de 30 días a 4 °C (8 y 30 días, respectivamente).

Del mismo modo el almacenamiento afectó ($p < 0,05$) tanto a la **estabilidad gravitacional** como a la **estabilidad térmica** de las DE y GDE (Publicaciones 4.1.2, 4.1.3 y 4.1.4). Si bien a lo largo de la conservación se produjo una disminución de los valores de ambos parámetros, en ningún caso la pérdida fue mayor del 6%. Por tanto, fueron cuantitativamente muy limitados (**Figura 32**), tanto en la DE donde apenas se apreció una separación de fases,

como en la GDE que mantuvo la estructura sólida sin apreciarse sinéresis, lo que indica la buena estabilidad de tales sistemas. La presencia de HXT no condicionó estas propiedades.

La conservación afectó significativamente el **color**, tanto de la emulsión doble elaborada con perilla y con HXT (DE-HTy-PO, Publicación 4.1.3), como de las emulsiones gelificadas elaboradas con perilla (GDE-C y GDE-Hyt, Publicación 4.1.4). En todas las muestras se produjo un descenso de los valores de luminosidad (L^*) y un aumento de los valores de b^* durante la conservación. Resulta plausible que, en las muestras con HXT, estos cambios de color puedan estar asociados a la presencia del biocompuesto en la fase acuosa externa, donde se podría favorecer su oxidación. Con lo que se puede acabar produciendo una posible transformación del HXT en quinonas con un color más pardo.

Así mismo, la conservación afectó al **comportamiento reológico y textural** de los sistemas. Se observó un aumento de los valores en los parámetros reológicos (G' y G''), consistente con el aumento de la dureza en los geles elaborados con perilla GDE-Hyt y GDE-C (Publicación 4.1.4). Tales fenómenos se atribuyen, entre otras causas, al aumento de las interacciones proteína-proteína durante el almacenamiento debido a la presencia de cierta actividad residual de MTG (Cofrades et al., 2006; Pintado et al., 2015a). Sin embargo, se ha señalado que otro posible mecanismo podría estar relacionado con cambios en la organización estructural de las gotas de grasa, los cuales se han asociado recientemente con efectos sobre las características estructurales de la matriz de gel (Oliver et al., 2016).

Igualmente, la **oxidación lipídica** se vio influenciada significativamente por la **conservación**, aunque tal efecto varía con las características de los sistemas (Publicaciones 4.1.1, 4.1.3 y 4.1.4). En el caso de las DE, los niveles de oxidación analizados por el índice de TBARS disminuyeron durante el almacenamiento. Si bien presumiblemente la multi-compartmentalización (características estructurales) de las DE está asociada a un incremento de la susceptibilidad de la oxidación (McClements y Decker, 2000; Waraho et al., 2010), este fenómeno no se manifestó en las muestras estudiadas en la presente tesis. La disminución observada, después de alcanzar determinados niveles de oxidación, puede deberse entre otras causas a la reactividad de los productos de oxidación secundaria (como el malondialdehído) con otros compuestos (p.ej. proteínas), a sus constituyentes (NaCas, estatus oxidativo de los aceites empleados), así como a sus condiciones de elaboración y conservación. Sin embargo, las GDE (Publicación 4.1.4, **Tabla 4**) se mostraron muy estables durante todo el periodo de conservación, ya que no se apreciaron cambios importantes en los valores de oxidación. Dicha estabilidad puede relacionarse al proceso de gelificación. A este respecto, se ha

demostrado que la gelatina reduce la oxidación de lípidos en emulsiones gelificadas (Sato et al., 2014), debido a la capacidad de localizarse en la interface aceite/agua, actuando así como una barrera que limita la interacción entre lípidos y prooxidantes (McClements y Decker, 2000). Además, se ha observado que el NaCas también inhibe dicho fenómeno, inactivando los radicales libres y secuestrando los metales prooxidantes como el Fe (Elias et al., 2008; Matalanis et al., 2012).

Del mismo modo, la presencia de HXT ejerció un efecto significativo en la prevención de la oxidación de las DE (4.1.1, Tabla 3) durante la conservación. Así, las muestras elaboradas con chía que contenían HXT (DE/HXT) mostraron una disminución más acusada que el control (DE/C), este hecho indica que el biocompuesto protege eficazmente contra la oxidación. Dicho efecto protector también ha sido descrito por Cofrades et al. (2011), encontrando que una concentración de 100 mg/kg de HXT proporcionó una gran protección contra la oxidación en emulsiones simples (ES) elaboradas con aceite de oliva. Por otro lado, en las GDE no se pudo observar el efecto protector del HXT frente a la oxidación durante el almacenamiento, ya que ambos sistemas (con y sin HXT) presentaron valores similares de oxidación. La estabilidad oxidativa de estos sistemas no solo depende de los factores asociados al antioxidante, sino también a su localización (en la interfaz aceite-agua), su liberación a la fase lipídica y otros aspectos relacionados con la naturaleza medio, como se ha descrito anteriormente. Al observar las variaciones relativas de la oxidación de las muestras con HXT frente a su control durante la conservación (**Figura 30**), se corrobora lo descrito anteriormente. En consecuencia, el HXT ejerció un mayor efecto protector en las DE elaboradas con aceite de chía a pesar de seguir presentando valores de oxidación más acusados que las GDE. En el caso de las GDE como apenas presentan cambios en el estado oxidativo, su efecto protector no es observable.

Del mismo modo, la conservación afectó significativamente la **capacidad antioxidante** de los sistemas. Generalmente, en las DE elaboradas con chía, las muestras que contenían HXT presentaron mayor actividad, aunque esta disminuyó acusadamente con el tiempo. Esto se puede atribuir a la interacción de este con otros compuestos lo cual permite una mayor protección de la fase lipídica. En el caso de las GDE, la actividad antioxidante también fue mayor ($p < 0,05$) en las GDE con HXT que sin el compuesto durante todo el experimento. Adicionalmente los valores de fotoquimioluminiscencia permanecieron constantes ($p > 0,05$) en las muestras GDE-C durante la conservación, aunque disminuyó ($p < 0,05$) acusadamente en las GDE-HXT. Esta disminución se relaciona con la pérdida del contenido de HXT

observada durante la conservación, lo que podría indicar una reducción de la capacidad del sistema para capturar radicales. Así mismo, las variaciones relativas de la capacidad antioxidante durante la conservación mostraron una mayor actividad en las GDE con HXT frente a las DE con HXT (**Figura 31**). Esto se puede relacionar con la presencia de gelatina, así como de los compuestos antioxidantes del aceite de perilla presentes en la GDE.

Por todo ello, la incorporación de este compuesto fenólico, HXT, presenta un gran interés tecnológico al retardar los procesos oxidativos en las emulsiones estructuradas, ya que al presentar ácidos grasos insaturados en su composición estos son más susceptibles de presentar fenómenos oxidativos.

El crecimiento microbiano en recuento total de bacterias se vio influenciado ($p < 0,05$) por la conservación de las GDE (Publicación 4.1.4). Este fue menos pronunciado en las muestras que presentaban HXT en su composición (GDE-HXT). Este comportamiento podría sugerir que el biocompuesto posee cierto poder antimicrobiano, como se observa principalmente durante las primeras semanas de conservación. Por tanto, este período (entre 8-15 días) se podría utilizar para establecer un tiempo límite para la adición como ingrediente en un producto cárnico.

Comparación de emulsión doble frente emulsión doble gelificada

Como resumen se puede indicar que, a pesar de que ambos sistemas presentan características similares a nivel nutricional, en los aspectos tecnológicos presentan ciertas diferencias. Concretamente las GDE a temperatura ambiente se encuentran en estado sólido (exhibiendo un comportamiento reológico elástico característico de un gel), similar al que presenta la grasa animal. Además, presentan una mejor protección frente a los fenómenos de oxidación, así como una mayor capacidad antioxidante debido, entre otras causas, a la presencia de agentes protectores frente a la oxidación como son la gelatina y el NaCas.

5.2. DESARROLLO DE PRODUCTOS CÁRNICOS FUNCIONALES.

Como se ha indicado anteriormente, entre los alimentos que más contribuyen a la ingesta de lípidos se encuentran los productos cárnicos. Debido a las consecuencias que tiene sobre la salud el perfil de AG que contienen estos productos, se hace necesario desarrollar estrategias más adecuadas para abordar procesos de reformulación enfocadas a la modificación de dicho contenido lipídico. Por tanto, una vez realizado el desarrollo y estudio de las DE y GDE de

acuerdo a los objetivos propuestos, se procedió a evaluar la posible mejora del contenido lipídico en diferentes matrices cárnicas (sistema modelo, salchichas tipo frankfurt y hamburguesas). El proceso de reformulación abordó la **disminución de la cantidad total de grasa y mejora del perfil lipídico** mediante la sustitución de tocino de cerdo por una **emulsión doble** y una **emulsión doble gelificada con HXT** (Publicaciones 4.2.1 y 4.2.2). A pesar de que existen numerosos estudios relacionados con el desarrollo de productos cárnicos con mejora de su contenido y perfil lipídico mediante la incorporación de emulsiones de aceite-en-agua (O/W) (Jiménez-Colmenero, 2007; Jiménez-Colmenero et al., 2015; Muschiolik y Dickinson, 2017), el uso de DE y GDE con aceite de perilla no ha sido estudiado como ingrediente en la formulación de productos cárnicos. Por tanto, es necesario evaluar como la presencia de estos ingredientes condiciona las propiedades de los productos.

En base a la composición nutricional y características como la textura, estado oxidativo y capacidad antioxidante, se escogieron aquellas DE y GDE que se consideraron más apropiadas para su incorporación en productos cárnicos. Igualmente, las características propias del producto y su proceso de elaboración condicionaron la elección de los análogos de grasa utilizados en su reformulación.

Primeramente, se hizo una aproximación en un sistema modelo cárnico tipo gel/emulsión (4.1.1), sustituyendo la grasa animal por una DE que contenía HXT encapsulado en su fase acuosa interna W_1 y un 30% de aceite chía como fase lipídica, con el fin de evaluar la actividad antioxidante del biocompuesto en las matrices que contenían la DE con HXT, así como el modo de incorporación.

Posteriormente, se estudiaron las posibilidades de utilización de los nuevos ingredientes lipídicos basados en DE en el desarrollo de productos cárnicos con composición lipídica más saludable. Para ello, se evaluó el efecto de la sustitución de la grasa animal por una DE (con un 30% de aceite de perilla) en las propiedades (capacidad ligante de agua y grasa, estado oxidativo, textura, color y características sensoriales) de las salchichas tipo frankfurt (Publicación 4.2.1). A su vez, se estudió el efecto de la sustitución parcial (66%) o total (100%) de la grasa animal por una GDE (elaborada con 30% de aceite de perilla, así como HXT encapsulado en la W_1) en la composición y en las propiedades (tecnológicas, sensoriales, oxidativas) de hamburguesas frescas crudas y cocinadas (Publicación 4.2.2).

En todo caso para entender y facilitar la discusión de los resultados obtenidos en el estudio la denominación y formulación de los distintos productos elaborados se detalla en la **Tabla 14**.

Tabla 14. Descripción de los sistemas cárnicos estudiados

	Tipo de muestra	Grasa		Bio-compuesto
		Modo de incorporación	Tipo de grasa y %	
MB/C	Sistema modelo	Directa	Tocino	12,0
MB/LO	Sistema modelo	Directa	Chía	12,0
MB/LO/HXT	Sistema modelo	Directa	Chía	12,0
MB/DE/C	Sistema modelo	DE	Chía	12,0
MB/DE/HXT	Sistema modelo	DE	Chía	12,0
N-PB	Salchicha tipo frankfurt	Directa	Tocino	27,0
R-PB	Salchicha tipo frankfurt	Directa	Tocino	10,0
R-PB-DE	Salchicha tipo frankfurt	DE	Tocino	10,0
R-LO	Salchicha tipo frankfurt	Directa	Perilla	10,0
R-PO-SE	Salchicha tipo frankfurt	SE	Perilla	10,0
R-PO-DE	Salchicha tipo frankfurt	DE	Perilla	12,0
NF/CS	Hamburguesa	Directa	Tocino	15,5
LF/GDE	Hamburguesa	GDE	Perilla	11,5
LF/GDE	Hamburguesa	GDE	Perilla	9,0

SE, emulsión simple; DE, emulsión doble; GDE, emulsión doble gelificadas; HXT, hidroxitirosol

5.2.1. Estudio nutricional de los productos cárnicos desarrollados

A la hora de evaluar aspectos nutricionales conviene recordar que la reformulación de los productos cárnicos se hizo en base a la disminución de su contenido graso y optimización de su perfil lipídico. Para tal fin se seleccionaron aceites vegetales como el de chía y de perilla, los cuales presentan altas concentraciones en AGP n-3, concretamente ALA (> 60%), así como un elevado contenido de sustancias antioxidantes (Dubois et al., 2007). Además, su consumo está asociado con reducciones del riesgo de ECV y cáncer (Nordoy et al., 2001). Concretamente, mientras que en las salchichas tipo frankfurt y en el sistema modelo se realizó el reemplazo de la grasa animal por una DE constituida con aceite de perilla y chía,

respectivamente, en las hamburguesas se hizo una sustitución total o parcial del tocino por una GDE elaborada con aceite de perilla.

A lo largo de este apartado se valorarán los aspectos nutricionales más relevantes de los productos cárnicos desarrollados, prestando especial atención a su perfil lipídico, aspecto fundamental del proceso de reformulación abordado para obtener productos con efectos funcionales.

El contenido en lípidos y humedad se vieron afectados por la reformulación en las salchichas y hamburguesas (Publicaciones 4.2.1 y 4.2.2). Tanto en las salchichas tipo frankfurt (Publicación 4.2.1, Tabla 2), como en las hamburguesas (Publicación 4.2.2) la humedad aumentó significativamente, mientras que el contenido lipídico disminuyó ($p < 0,05$) en todos los productos reformulados al sustituir la grasa animal bien por DE en las salchichas o por GDE en el caso de las hamburguesas. Los resultados fueron consistentes con el diseño experimental planteado, ya que la reducción de grasa se realizó por el aumento del contenido de agua (ya sea a partir de agua añadida o de agua presente en la DE o en la GDE). No obstante, a diferencia de las salchichas en las hamburguesas el proceso de reformulación también afectó ($p < 0,05$) al contenido en proteínas, aumentado respecto a la muestra elaborada con grasa animal, debido a la composición de los geles (gelatina).

En cuanto al valor energético las variaciones entre las muestras reformuladas no fueron muy elevadas. En las salchichas, la muestra control elaborada con un ~30% de grasa animal (N-PB, **Tabla 14**) presentó un **contenido energético** de 312,7 kcal/100 g, del cual un 78% procedía de la grasa animal; mientras que la reformulada con una DE con aceite de perilla (R-PO-DE) disminuyó a 170 kcal/100 g, proviniendo un 58% del análogo de grasa. Por otro lado, en las hamburguesas, la muestra elaborada con un 15% de grasa animal (NF/CS) mostró un contenido calórico cercano a las 200 kcal/100 g, procediendo un 65% de la grasa animal; sin embargo, en la muestra con sustitución total (LF/GDE) fue de 153,84 kcal/100 g, aportando la grasa el 47% de las calorías.

La formulación ejerció efecto significativo sobre el perfil de **ácidos grasos** (% FAME, *fatty acid methyl ester*) en ambos productos. En las salchichas tipo frankfurt, el perfil de los análogos de grasa utilizados en la reformulación (grasa animal o perilla) condicionó el contenido de AG del producto final (**Figura 33**), independientemente del modo de incorporación (directa, SE, DE, **Tabla 14**). De la misma manera, el perfil de AG en las hamburguesas también se vio condicionado ($p < 0,05$) por el tipo de grasa utilizada en la sustitución parcial (66% perilla)

o total (100% perilla), pero no por el cocinado (aparatado **4.2.2**). En ambos estudios la muestra control presentó los valores más altos ($p<0,05$) de AGS y AGM (ácido oleico principalmente) (**Figura 33**), evidenciándose un descenso significativo de ambos tipos de AG al sustituir la grasa animal por los análogos de grasa. Como ambos sistemas fueron elaborados con aceite de perilla, se observó un aumento de los AGP ($p<0,05$), causado por el incremento de ALA. Por otro lado, en los productos reformulados la concentración de AGS y AGM fue mayor en hamburguesas que en salchichas, con lo cual los AGP presentaron mayor contenido en salchichas que en hamburguesas. Estas diferencias se deben a la estrategia de formulación, porcentaje de grasa, tipo análogo de grasa incorporado (DE o GDE), materia prima), y procesado (condiciones de elaboración, aplicación de tratamientos térmicos, etc.).

Como se comentó anteriormente, cuando la **relación AGP/AGS** es mayor de 0,4 indica la buena calidad nutricional de la fracción lipídica de los alimentos. El efecto del proceso de reformulación condicionó dicha relación tanto en salchichas como en hamburguesas. Las muestras elaboradas con grasa animal en ambos estudios poseen ratios inferiores a 0,4 (**Figura 34**). Sin embargo, las salchichas (R-PO-DE) y hamburguesas (LF/GDE) reformuladas únicamente con análogos de grasa de perilla (DE y GDE) obtuvieron valores de 6 y 3 respectivamente, que se encuentran más en consonancia con las recomendaciones nutricionales actuales (Publicaciones **4.2.1** y **4.2.2**). Se ha observado el mismo efecto en otros productos cárnicos elaborados con distintos aceites vegetales (Lopez-Lopez et al., 2009; Delgado-Pando et al., 2011; Salcedo-Sandoval et al., 2015b).

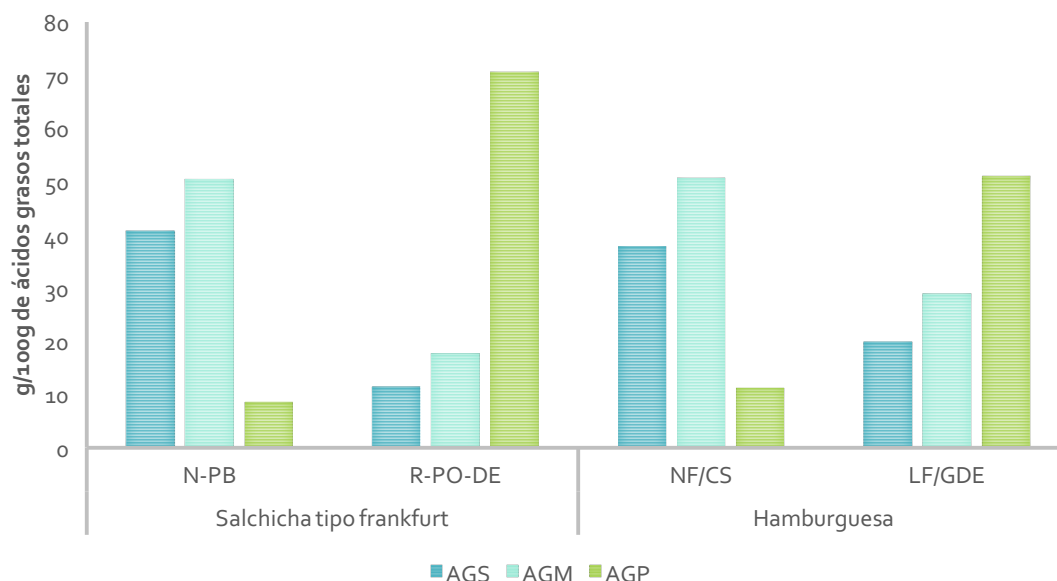


Figura 33. Análisis comparativo de la presencia de distintos ácidos grasos en salchicha frankfurt y hamburguesa. N-PB: salchicha control (con solo grasa animal); **R-PO-DE:** salchicha elaborada mediante la sustitución total de grasa animal por una DE formulada con aceite de perilla; **NF/CS:** hamburguesa control (solo grasa animal) y **LF/GDE:** producto elaborado sustituyendo totalmente la grasa animal por GDE formulada con aceite de perilla. Adaptado de las publicaciones 4.2.1 y 4.2.2.

La **relación $n-6/n-3$** está asociada con la patogénesis de muchas enfermedades entre las que se encuentran las ECV (OMS, 2003), siendo un valor menor de 4 indicativo de efecto protector. Las distintas estrategias de reformulación (independientemente de la forma de incorporación del aceite de perilla) condicionaron la relación $n-6/n-3$ de los productos. En los productos reformulados se obtuvieron valores próximos a 0,3 en las salchichas (R-PO-DE) y 0,5 en el producto fresco (hamburguesa, LF/DE). Estos fueron significativamente inferiores a los encontrados en productos similares elaborados con grasa de cerdo (N-PB y NF/CS, salchicha y hamburguesa respectivamente), donde alcanzaron valores de entre 13-17 (**Figura 34**). Dicha mejora se atribuye básicamente a cambios relativos en la proporción de ALA por la incorporación de aceite de perilla.

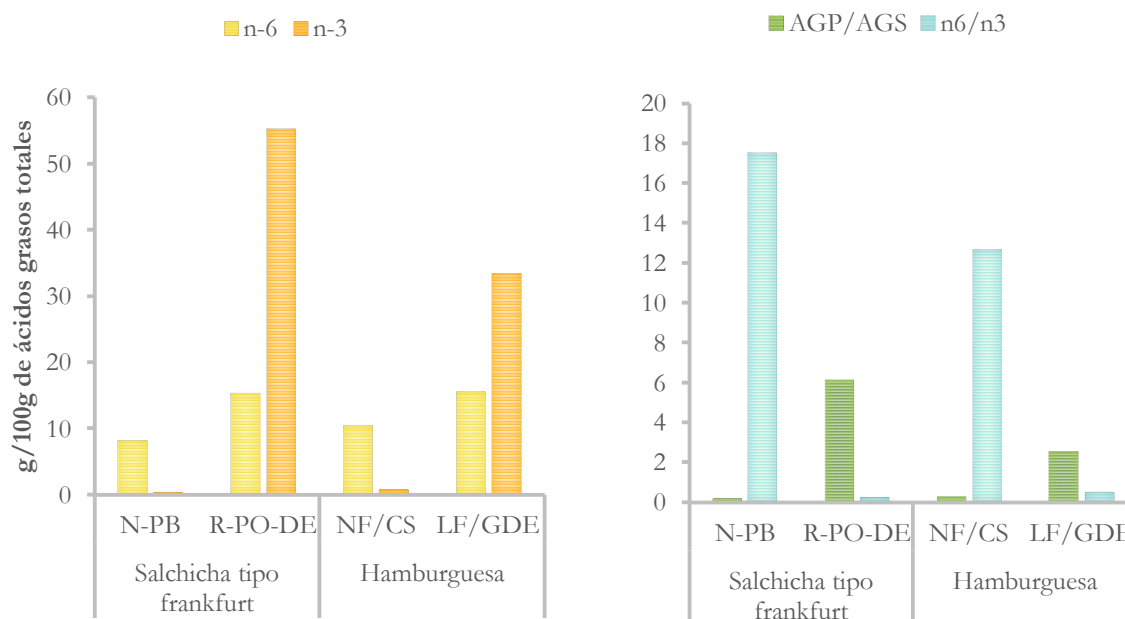


Figura 34. Análisis comparativo de la cantidad de n-6, n-3 e índices de calidad de la grasa (relación AGP/AGS y n-6/n-3) de salchicha frankfurt y hamburguesa. N-PB: salchicha control (con solo grasa animal); **R-PO-DE:** salchicha elaborada mediante la sustitución total de grasa animal por una DE formulada con aceite de perilla; **NF/CS:** hamburguesa control (solo grasa animal) y **LF/GDE:** producto elaborado sustituyendo totalmente la grasa animal por GDE formulada con aceite de perilla. Adaptado de las Publicaciones 4.2.1 y 4.2.2.

Según la normativa europea sobre las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables de los alimentos (Reglamento CE no 1924/2006 y UE no 116/2010), los productos elaborados podrían llevar en su etiquetado las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables señaladas en las **tablas 15** y **16**, respectivamente. Esto supone que la ingesta de estos productos pueda proporcionar beneficios para la salud.

Tabla 15. Ejemplo de declaraciones nutricionales correspondientes a las salchichas (12,5% grasa) y hamburguesas (12,0% y 9,0% grasa) reformulados en el estudio. Adaptado del Reglamento (CE) 1924/2006.

Declaración	Condiciones de uso	Producto cárnico
Alto contenido de grasas insaturadas.	El 70 % o más de los ácidos grasos presentes en el producto proceden de grasas insaturadas y las grasas insaturadas aportan más del 20 % del valor energético del producto.	Salchichas R-PO-DE: 78,4% de grasas insaturadas, siendo el 46,6% del valor energético ingerido (Publicación 4.2.1). Hamburguesas LF/GDE: 80% de grasas insaturadas siendo un 42,6% del valor energético (Publicación 4.2.2).
Fuente de ácidos grasos n-3.	Alimentos que contienen al menos 0,3 g de ALA por 100 g y por 100 kcal o al menos 40 mg de la suma de EPA y DHA por 100 g y por 100 kcal.	Salchichas R-PO-DE: 5,3g/100g (Publicación 4.2.1). Hamburguesas LF/GDE y MF/GDE: mínimo 2g/100g (Publicación 4.2.2).
Valor energético reducido (<i>en grasa</i>).	El valor energético se reduce, como mínimo, en un 30 %, con una indicación de la característica o características que provocan la reducción del valor energético total del alimento.	Salchichas R-PO-DE: disminuyó un 45,6% su contenido valor energético al disminuir el contenido en grasa (Publicación 4.2.1). Hamburguesas LF/GDE disminuyó un 30,0% su contenido valor energético, al disminuir el contenido en grasa (Publicación 4.2.2).
Alto contenido de proteínas.	Las proteínas deben aportar como mínimo el 20 % del valor energético del alimento.	Salchicha R-PO-DE: 40,0% (Publicación 4.2.1). Hamburguesas LF/GDE y MF/GDE: mínimo 41,4% (Publicación 4.2.2).

Tabla 16. Ejemplos de declaraciones de propiedades saludables aplicadas para las salchichas (12,5% grasa) y hamburguesas (12,0% y 9,0% grasa) reformulados en el estudio. Adaptado del Reglamento (CE) No 423/2012.

Declaración	Condiciones de uso	Producto cárnico
<p>Ácido α-linolénico (ALA)</p> <p>El ácido α-linolénico contribuye a mantener niveles normales de colesterol sanguíneo.</p>	<p>Alimentos que como mínimo son fuente de ácido α-linolénico de acuerdo con la declaración de FUENTE DE ÁCIDOS GRASOS OMEGA-3 del Reglamento (CE) no 1924/2006. Se informará que el efecto beneficioso se obtiene con una ingesta diaria de 2 g de este ácido graso.</p>	<p>Salchichas R-PO-DE (Publicación 4.2.1).</p> <p>Hamburguesas LF/GDE y MF/GDE (Publicación 4.2.2).</p>
<p>Ácidos grasos monoinsaturados o poliinsaturados (AGM y AGP)</p> <p>La sustitución de grasas saturadas por grasas insaturadas contribuye a mantener niveles normales de colesterol sanguíneo (los ácidos grasos monoinsaturados o poliinsaturados son grasas insaturadas).</p>	<p>Alimentos con alto contenido de ácidos grasos insaturados, de acuerdo con la declaración ALTO CONTENIDO DE GRASAS INSATURADAS del Reglamento (CE) no 1924/2006.</p>	<p>Salchichas R-PO-DE (Publicación 4.2.1).</p> <p>Hamburguesas LF/GDE y MF/GDE (Publicación 4.2.2).</p>

En cualquier caso, y teniendo en cuenta que los productos reformulados deben tener similares atributos de calidad que sus homólogos tradicionales, resulta necesario analizar las consecuencias de los cambios inducidos sobre las propiedades de los derivados cárnicos, lo cual se discute a continuación.

5.2.2. Caracterización de los productos: propiedades físico-químicas, texturales, microbiológicas y sensoriales.

En este apartado se analizarán las consecuencias de los procesos de reformulación, conservación y cocinado sobre las características de los productos cárnicos, incluyendo las propiedades físico-químicas, oxidativas, microbiológicas y sensoriales.

Las **propiedades ligantes de agua y grasa** son unos de los parámetros más importantes en productos cárnicos, como en las salchichas tipo frankfurt (Publicación 4.2.1), ya que afectan a la calidad final del producto. Estos parámetros se pueden determinar con distintas metodologías en función del tratamiento ensayado (térmico y procesado). Las **pérdidas por procesado** se encuentran entre un 14 y 16%, en consonancia con lo encontrado por otros autores en productos similares (Delgado-Pando et al., 2010a; Salcedo-Sandoval et al., 2013). La muestra elaborada con 30% de grasa animal (N-PB) presentó valores más bajos ($p < 0,05$) que RF-PO-DE (reformulada con DE de perilla). No obstante, las pérdidas no se vieron afectadas ($p > 0,05$) por la estrategia de reformulación (tipo de grasa, ni modo de incorporación) (**Figura 35**). Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas en las **pérdidas totales**, así como en las pérdidas de agua y grasa. En todas las muestras, el ~93% de las pérdidas se produjo debido al agua y solo un ~7% a la grasa. Este hecho sugiere que la matriz proteica fue estable, presentando una estructura con gran capacidad de retención de agua y grasa. Resultados similares han sido reportados anteriormente por otros autores con la utilización de DE elaboradas con aceite de oliva en sistemas modelo (Cofrades et al., 2013).

El **color** constituye uno de los parámetros más importantes por su influencia en el consumidor a la hora de elegir un producto. El **proceso de reformulación** fundamentado en el reemplazo de grasa animal dio lugar a modificaciones significativas ($p < 0,05$) en las salchichas tipo frankfurt (Publicación 4.2.1, Tabla 5). Así, la muestra reformulada con una DE de aceite de perilla (R-DE-PO), presentó valores más altos de luminosidad (L^*) que las elaboradas con un 30% y un 15% de grasa animal (N-BF y R-BF, respectivamente). También presentó una mayor tendencia al amarillo (b^*) ($p < 0,05$) que la muestra con un 15% de grasa animal (R-BF). Por el contrario, R-DE-PO mostró un descenso ($p < 0,05$) en la tendencia al rojo (a^*) frente a N-BF y R-BF. En este sentido, los resultados obtenidos se encuentran en consonancia a los mostrados por otros autores, los cuales obtuvieron valores mayores de L^* y menores en a^* al incorporar una DE en una matriz cárnica (Cofrades et al., 2013; Ozturk et al., 2017).

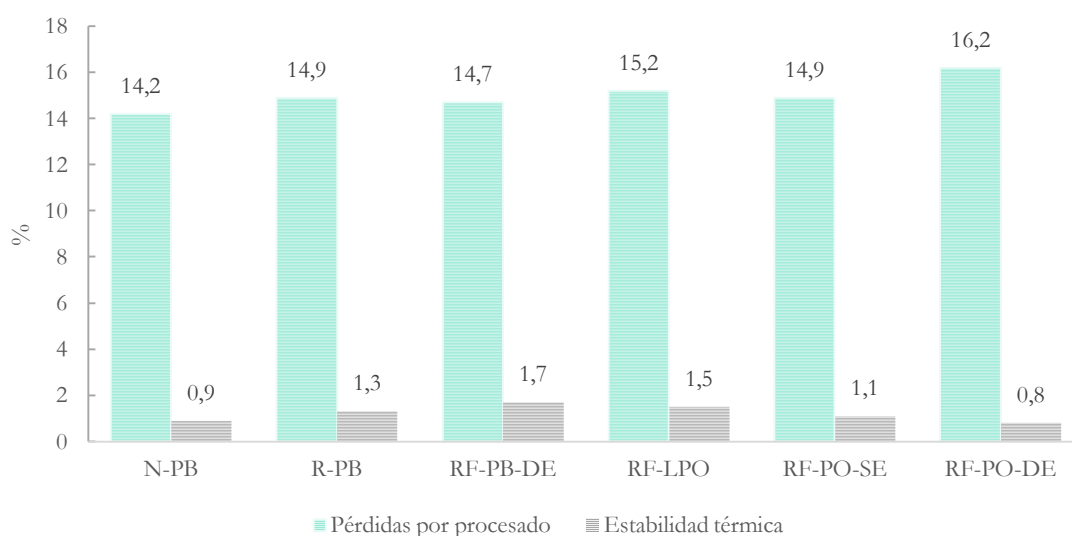


Figura 35. Propiedades ligantes de agua y grasa (pérdidas por procesado y estabilidad térmica, %) de salchichas tipo frankfurt. **N-PB**: salchicha con 30% de grasa animal; **R-PB**: salchicha reformulada con 15% de grasa animal; **RF-PB-DE**: salchicha reformulada con doble emulsión de tocino; **RF-LPO**: salchicha reformulada con aceite de perilla incorporado directamente; **RF-PO-SE**: salchicha reformulada con emulsión simple de perilla; **RF-PO-DE**: salchicha reformulada con emulsión doble de aceite de perilla. Información más detallada en **Tabla 14**.

La **textura** es otro factor importante que condiciona la aceptación o rechazo del alimento por el consumidor. La **reformulación** afectó significativamente la textura tanto en salchichas tipo frankfurt, como en hamburguesas. En los productos gel/emulsión (salchichas) (Publicación 4.1.3, Tabla 5) la sustitución de grasa animal por DE con aceite de perilla (R-PO-DE) conllevó a una disminución de la dureza con respecto a las muestras con un 27% y un 12% de grasa animal (N-PB y R-PB, respectivamente), aunque estas diferencias solo fueron significativas respecto a la N-PB. Esto puede estar relacionado con el hecho de que al mantener el contenido proteico constante y reemplazar la grasa por una DE, que contiene un 60% agua, dé a lugar de matrices menos densas y compactas (Claus y Hunt, 1991; Jiménez-Colmenero, 1996). No obstante, estos datos divergen con los obtenidos en otras matrices cárnicas, concretamente en sistemas modelo, pudiendo relacionarse este comportamiento a las diferencias en el contenido de lípidos entre las salchichas y los sistemas modelo, así como a la formulación de las DE elaboradas (Cofrades et al., 2013). Por otro lado, el modo de incorporación del aceite de perilla bien de forma directa o bien en forma de emulsión simple (SE) o DE, descrito en la **Tabla 14**, no ocasionó cambios en la textura de las muestras reformuladas (todas con un 12% de grasa).

En los productos frescos (hamburguesas) (Publicación 4.2.2, Tabla 2), el **proceso de sustitución** de la grasa animal por una GDE también afectó ($p < 0,05$) a la fuerza máxima de corte (KSF). Inicialmente la muestra que presentaba un 15% de grasa animal (NF/CS) presentó valores menores de KSF que las reformuladas parcial (66%) o totalmente (100%) con GDE (MF/GDE y LF/GDE, respectivamente), que presentaron entre sí valores similares de KSF. Este aumento en las muestras reformuladas se debe a las propiedades texturales del material lipídico incorporado (GDE) que aporta más firmeza a la matriz en comparación a la textura de la grasa animal. Estos resultados difieren con los obtenidos por otros autores, los cuales apreciaron valores más bajos al sustituir la grasa animal por aceite de palma parcialmente hidrogenada o aceite de pescado en hamburguesas (Babji et al., 1998; Keenan et al., 2015). Estas diferencias se pueden deber a que la GDE utilizada en la presente tesis muestra una consistencia más próxima a la grasa animal, como se ha descrito en el apartado 5.1.2, con lo cual hace pensar que podría dar lugar a una textura más firme. Sin embargo, otros autores no han observado modificación en la textura de las hamburguesas al sustituir el tocino por un agente de carga a base de konjac (Salcedo-Sandoval et al., 2015a).

La **conservación** (4 °C) modificó significativamente la **textura** en las hamburguesas (Publicación 4.2.2, Tabla 2). En todas ellas se produjo un aumento de los valores de KSF durante 14 días, siendo dicho incremento significativo en las muestras con sustitución de la grasa animal del 66% (MF/GDE) y del 100% (LF/GDE). Este comportamiento se puede atribuir al aumento de la dureza que experimentan las GDE durante su conservación, observado en el estudio de caracterización de las mismas en la Publicación 4.1.4 (reflejado en los valores de TPA y estudio reológico) y discutido previamente. No obstante, Salcedo-Sandoval et al. (2015a) no observó diferencias en textura durante la conservación en refrigeración al sustituir la grasa animal por un agente de carga a base de konjac.

El **proceso de cocinado** también afectó ($p < 0,05$) a la **textura** de las hamburguesas (Publicación 4.2.2, Tabla 2), ya que produjo la formación de estructuras más firmes, observándose los valores más altos de KSF en aquellos productos elaborados con sustitución total de la grasa animal por GDE (LF/GDE), este hecho también fue observado por Salcedo-Sandoval et al. (2015a) en hamburguesas con sustitución de grasa animal por agente de carga a base de konjac. No obstante, el **proceso de conservación** no influyó ($p > 0,05$) en el **efecto del cocinado**, al igual que lo observado por Salcedo-Sandoval et al. (2015a).

Como se observa en la **Figura 36** (variaciones relativas en la dureza de las salchichas medida por medio del ensayo de TPA y en la fuerza requerida en hamburguesas medida por medio

del ensayo de Kramer frente a sus controles respectivos), con independencia del contenido en grasa, la presencia de DE origina la formación de matrices cárnicas que exhiben estructuras más blandas que las mostradas por las salchichas formuladas solo con grasa animal. Contrariamente el reemplazo total de grasa animal por GDE en hamburguesas induce un aumento de la fuerza en el ensayo KSF. Estas diferencias en el comportamiento se pueden atribuir a varios factores relacionados con el proceso de reformulación del producto cárnico (cantidad de grasa, proteína, agua), tipo de producto (al grado de desintegración estructural de los mismos), características del análogo de grasa incorporado (DE o GDE), así como al distinto procesado de los mismos.

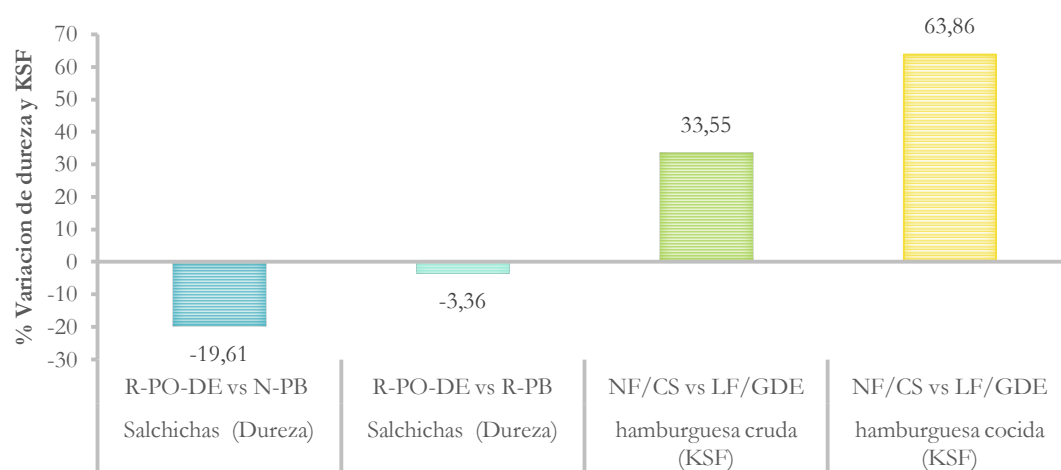


Figura 36. Variaciones de dureza (ensayo TPA) en las salchichas tipo frankfurt frente a un control con 30 % de grasa animal (N-PB) y otro con 15% de grasa (R-PB), así como las variaciones de la fuerza requerida (ensayo KSF) en las hamburguesas crudas o cocidas respecto a su control (NF/CS). R-PO-DE: salchicha tipo frankfurt con sustitución total de grasa animal por DE; **LF/GDE:** hamburguesa con sustitución total de grasa animal por GDE.

La **reformulación** de los productos ha conllevado a la incorporación de un aceite rico en AGP n-3, con lo cual se hace imprescindible la determinación de la **oxidación lipídica** para evaluar si este aumento de la insaturación se manifiesta en mayores niveles de oxidación. La reformulación condicionó significativamente el comportamiento oxidativo del sistema modelo gel/emulsión, las salchichas y las hamburguesas (Publicaciones 4.1.1, 4.2.1, y 4.2.2). Tanto las salchichas tipo frankfurt como los sistemas modelo, elaborados con DE con aceites vegetales ricos en AGP n-3, presentaron un aumento en la oxidación lipídica frente a las muestras con grasa animal (**Figura 37**). En los sistemas modelo, las diferencias encontradas inicialmente en los niveles de oxidación pueden atribuirse principalmente al efecto inducido

por el tratamiento térmico durante el proceso de elaboración del producto, que es dependiente de la formulación, ya que las muestras con DE al presentar AGP n-3 (MB/DE/C y MB/DE/HXT, **Tabla 13**), son más susceptible de oxidación que las muestras elaboradas con grasa animal. Aunque cabe desatacar que el sistema elaborado con una emulsión doble con HXT encapsulado en la W_1 (MB/DE/HXT) presentó unos valores de oxidación de un 67% menor que MB/DE/C, con lo cual el HXT ejerció un efecto protector. La capacidad de HXT para inhibir la oxidación ya se ha demostrado en aceite de pescado y productos elaborados con dicho aceite (Pazos et al., 2008; Medina et al., 2009), así como en productos cárnicos precocidos (DeJong y Lanari, 2009). En el caso de las salchichas, los niveles fueron similares independientemente del modo de incorporación del aceite, ya sea como SE o DE (RF-PO-SE y RF-PO-DE). En estas muestras se observaron niveles de oxidación similares a los reportados en este tipo de productos por otros autores (Salcedo-Sandoval et al., 2013). En cualquier caso, los valores de oxidación obtenidos en todas las salchichas reformuladas fueron inferiores a 1,0 mg/kg, que es el umbral que algunos autores han descrito, para la detección organoléptica de la rancidez en productos cárnicos (Paneras et al., 1994).

Sin embargo, en general las hamburguesas elaboradas con GDE de aceite de perilla (MF/GDE y LF/GDE) mostraron valores de oxidación inferiores ($p < 0,05$) a la formulada con grasa animal (NF/CS) (**Figura 37**). En particular, la muestra LF/GDE (sustitución total) fue la que presentó los valores más bajos de oxidación al contener menor cantidad de grasa total (9,2%). La baja oxidación de ambas muestras se puede deber entre otros factores, al efecto protector del HXT (encapsulado en la W_1 en las GDE), descrito anteriormente por Cofrades et al. (2011b), así como a la disminución del contenido lipídico, que llega a alcanzar un 25% en MF/GDE y hasta el 40% en LF/GDE, respecto a la muestra NF/CS. No obstante, estos resultados difieren con los publicados por Salcedo-Sandoval et al. (2015a), en los que al sustituir la grasa animal parcial o totalmente por un gel de carga (elaborado con aceite de oliva, lino y pescado) la oxidación aumentaba en proporción al nivel de sustitución. Estas discrepancias se pueden deber a las diferencias estructurales de los análogos de grasa utilizados y/o al agente antioxidante utilizado en las GDE.

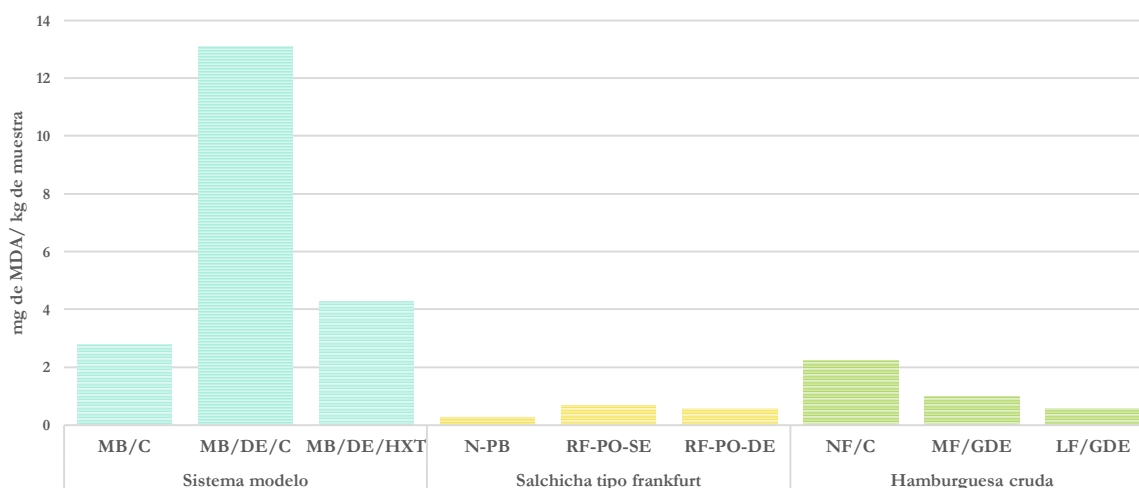


Figura 37. Oxidación lipídica (valores de TBARS expresado en mg de MDA/ Kg de muestra) tras la elaboración en MB/C: sistema modelo elaborado con grasa animal; **MB/DE/C:** sistema modelo elaborado emulsión doble; **MB/DE/HXT:** sistema modelo con emulsión doble con HXT; **N-PB:** salchicha tipo frankfurt con 30 % de grasa animal; **RF-PO-SE:** salchichas tipo frankfurt elaboradas con emulsión simple; **RF-PO-DE:** salchicha tipo frankfurt con emulsión doble; **NF/CS:** hamburguesa cruda elaborada con grasa de cerdo; **MF/GDE:** hamburguesa con sustitución parcial de grasa animal por GDE; **LF/GDE:** hamburguesa con sustitución total de grasa animal por GDE.

La **conservación en condiciones de refrigeración** (4 °C) también afectó ($p < 0,05$) al comportamiento **oxidativo** tanto en el sistema modelo como en las hamburguesas (Publicación 4.1.1 y 4.2.2). En el sistema modelo, los productos que incorporaban DE con y sin HXT obtuvieron un comportamiento distinto en los niveles de oxidación. Así, la muestra que fue elaborada con DE con chía y sin HXT (MB/DE/C) presentó elevados niveles de oxidación que fueron disminuyendo a lo largo de la conservación hasta finalizar con un pequeño incremento (Publicación 4.1.1, Tabla 3). Mientras que la elaborada con una DE con chía y HXT encapsulado en la W_1 (MB/DE/HXT) mantuvo un descenso de los valores de oxidación durante los 39 días. Al finalizar el estudio, esta presentó valores de oxidación un 75% inferior al mostrado por la muestra MB/DE/C, lo que confirma el efecto protector del biocompuesto frente a la oxidación, como ya ha descrito anteriormente. Dicho efecto también se observó en el sistema MB/LO/HXT elaborado con aceite de chía incorporado directamente el HXT sobre la matriz. Generalmente, en las hamburguesas, durante la mayor parte del estudio desde el día 1 al 8 de conservación, las muestras con sustitución parcial y total de grasa animal por GDE (MF/GDE y LF/GDE) presentaron niveles más bajos de oxidación frente a la muestra elaborada con grasa animal (NF/CS). Sin embargo, al finalizar el estudio mostraron valores más altos. Los mayores índices de oxidación encontrados al finalizar el experimento son consistentes con una mayor presencia de AG insaturados en los

productos reformulados con GDE, así como al posible “agotamiento” del efecto protector del HXT.

El **proceso de cocinado** de las hamburguesas también afectó ($p<0,05$) el **nivel oxidativo**. Inicialmente, todas las hamburguesas cocinadas presentaron un aumento de los valores de oxidación frente sus muestras “crudas”. Las muestras reformuladas con GDE (MF/GDE y LF/GDE) presentaron los mayores niveles, ya que el cocinado de los productos enriquecidos con AGP pueden experimentar mayores valores de oxidación. Así mismo, todas las muestras aumentaron su estado oxidativo al finalizar el estudio (día 14), siendo LF/GDE (con sustitución total de grasa animal por AGP n-3) la que mostró los valores más acusados. Ganhão et al. (2013) han descrito un incremento de la oxidación durante la conservación en los productos cárnicos cocinados. Este comportamiento está en consonancia con la composición de AGP n-3 de las GDE (procedente del aceite de perilla) que son más sensibles a los procesos de oxidación.

En general, se puede decir que la sustitución de la grasa animal por aceite rico en AGP en forma de DE y GDE en salchichas tipo frankfurt y hamburguesas, no supuso un aumento en proporciones suficientemente relevantes de la oxidación lipídica como para tener consecuencias limitantes en los productos.

El **proceso de reformulación** condicionó significativamente la **capacidad antioxidante** (DPPH) de los sistemas modelo (Publicación 4.1.1). El producto reformulado con una DE con HXT (MB/DE/HXT) presentó casi el doble de actividad antioxidante que las muestras elaboradas con una DE sin HXT (MB/DE/C) y de aquellas con grasa animal (MB/C) (**Figura 38**, en punteado). El efecto antioxidante del HXT fue más pronunciado (8% mayor) en las muestras que contenían el biocompuesto incorporado directamente (MB/LO/HXT) que encapsulado en la DE (MB/DE/HXT). Esta diferencia se puede atribuir a distintos factores, entre ellos, los asociados a los distintos ingredientes no cárnicos. Por otro lado, el **proceso de conservación** afectó a la capacidad antioxidante de todas las muestras ($p<0,05$). A partir del día 7 esta decreció considerablemente, hasta finalizar el estudio con valores 30 veces menores que al inicio en la MB/DE/HXT y próximos al del control (MB/DE/C) (**Figura 38**). Al concluir el experimento, a pesar de haber diferencias significativas entre los valores determinados, estas son de escasa relevancia cuantitativa. Min et al. (2008) sugieren que antioxidantes endógenos del sistema cárnico tales como carnosina y anserina pueden actuar contra los radicales libres. La actividad antioxidante mostrada por MB/DE/HXT, así como sus niveles bajos de oxidación respecto al sistema modelo enriquecido con AGP sin

antioxidante (MB/DE/C), sugieren que el HXT es beneficioso para mantener los niveles de oxidación en los productos.

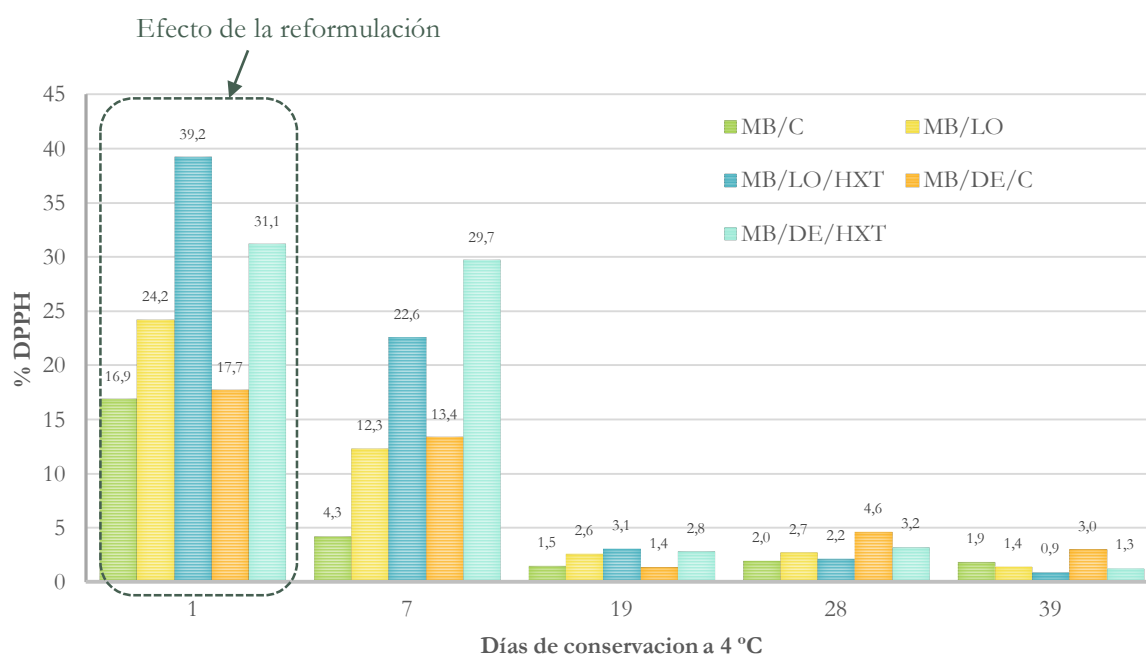


Figura 38. Capacidad antioxidante de los sistemas modelo. MB /C (control): hecho con grasa de cerdo; **MB/LO:** formulado mediante la sustitución de grasa de cerdo con aceite de chía líquido; **MB/LO/HXT:** similar a MB/LO pero incluyendo HXT (100 mg / 1000 g) disuelto en el agua añadida; **MB/DE/C:** formulada sustituyendo la grasa trasera de cerdo por las emulsiones dobles (DE/C; Tabla 12); **MB/DE/HXT:** se formuló la sustitución de la grasa de cerdo con las emulsiones dobles con HXT encapsulado (DE/HXT).

La **carga microbiana** (aerobios totales) presente en las hamburguesas se vio influenciada ($p < 0,05$) por el proceso de **reformulación** (Publicación 4.2.1, Tabla 3). Las muestras con sustitución total de grasa animal (LF/GDE) presentaron mayores ($p < 0,05$) niveles de microorganismos que las elaboradas con grasa animal y con sustitución parcial (NF/BF y MF/GDE, respectivamente). En cualquier caso, todas las muestras presentaron valores menores a 6 log ufc/g, típico de este tipo de productos cárnicos (Lorenzo et al., 2014; Salcedo-Sandoval et al., 2015a). La **conservación** también afectó significativamente el recuento microbiano, que aumentó a lo largo del estudio como era esperable, aunque no se encontró ninguna relación entre el proceso de sustitución de la grasa y un aumento de microorganismos, en consonancia con lo descrito por Salcedo-Sandoval et al. (2015a).

La **evaluación sensorial** es uno de los aspectos esenciales a tener en cuenta para valorar un nuevo producto. Independientemente de los demás análisis, este es el que determina el grado de aceptación o rechazo del producto. En tal sentido, se ha estudiado la influencia de la incorporación de los análogos de grasa en las salchichas y en las hamburguesas (Publicaciones

incorporación de los análogos de grasa en las salchichas y en las hamburguesas (Publicaciones 4.2.1, Tabla 6 y 4.2.2, Figura 1). El **proceso de reformulación** afectó ($p < 0,05$) a la **aceptabilidad** de los atributos sensoriales en las salchichas tipo frankfurt y hamburguesas. En los productos tipo gel/emulsión (salchichas) el producto elaborado con sustitución de grasa por una DE con perilla (R-PO-DE) mostró valores significativamente menores frente las muestras elaboradas con grasa animal (N-PB y R-PB) en la **aceptabilidad general**, de **sabor** y de **textura** (Figura 39). Así mismo, la muestra elaborada con SE (R-PO-SE) también presentó menor puntuación ($p < 0,05$) en la **aceptabilidad de textura y general** respecto a N-PB y R-PB. Sin embargo, R-PO-SE y R-PO-DE no mostraron diferencias significativas con R-LPO (salchicha con aceite de perilla incorporado directamente) en el atributo de **sabor**, así como en el caso de R-PO-SE en el parámetro **textura**. Si bien, esta menor aceptabilidad general en las muestras reformuladas con SE y DE podrían deberse a que los productos derivados de la oxidación de los AGP n-3 (más susceptibles que los AGS) podrían aportar un sabor indeseable (Jiménez-Colmenero, 2007), todas las muestras formuladas con aceite de perilla (adición directa, SE y DE) exhibieron niveles de oxidación similares. Con lo cual, hace pensar que las diferencias en la aceptabilidad general pueden deberse bien a que una alta concentración de AGP (en nuestro caso $> 2\text{g}$ de ALA en 100g de AG) puede alterar la percepción del sabor y en la sensación en boca “*mouthfeel*” (Weel et al., 2004; Vingerhoeds et al., 2008), o bien a que el atributo textura condicionó la aceptabilidad general.

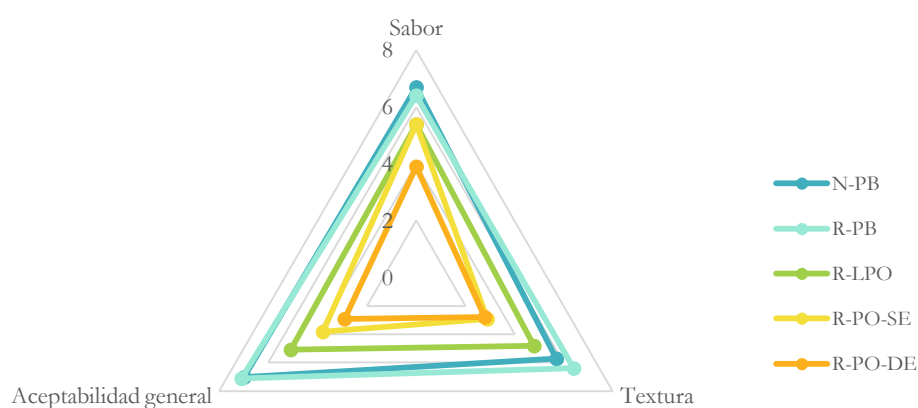


Figura 39. Evaluación de la aceptabilidad en salchichas tipo frankfurt. **N-PB:** salchicha tipo frankfurt con 30 % de grasa animal; **R-PB:** salchicha frankfurt con reducción de grasa animal; **R-LPO:** salchichas tipo frankfurt elaboradas con aceite de perilla; **R-PO-SE:** salchichas tipo frankfurt elaboradas con emulsión simple de perilla; **R-PO-DE:** salchicha tipo frankfurt con emulsión doble de perilla.

Por otro lado, en las hamburguesas la reformulación parcial de grasa animal con un 66% de GDE (MF/GDE) no afectó ($p>0,05$) a la aceptabilidad de todos los atributos analizados frente a la muestra elaborada con grasa animal (NF/CS), salvo en la aceptabilidad del sabor (Figura 40). Sin embargo, la muestra con sustitución total sí presentó diferencias significativas en todos los parámetros de aceptabilidad, salvo en el de la jugosidad. Así mismo, entre las muestras reformuladas con dichos sistemas de incorporación (MF/GDE y LF/GDE) solo hubo diferencias significativas en la aceptabilidad general. Cabe remarcar que la muestra reformuladas con GDE presentaron menor dureza que la NF/CS. Esto valores discrepan con los obtenidos en el ensayo KSF (valores más altos en las muestras GDE que en NF/CS). Por tanto, estas discrepancias pueden deberse a la gran complejidad de análisis sensorial ya que engloba múltiples parámetros; pudiendo ser necesario proporcionar capacitación adicional en la evaluación de este atributo.

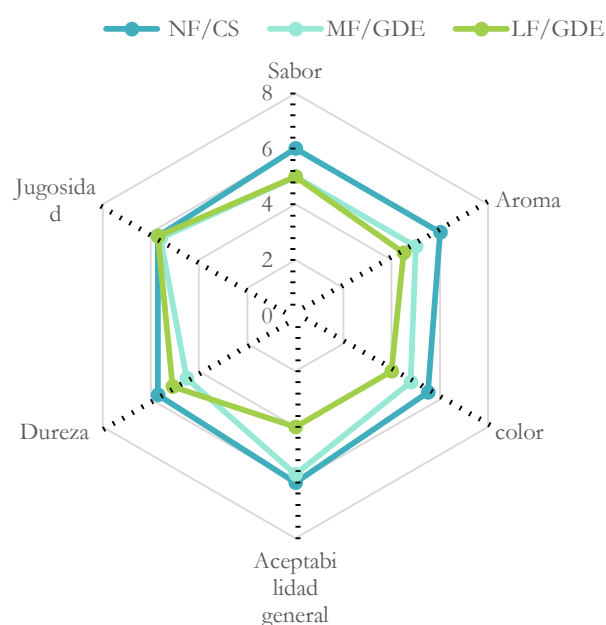


Figura 40. Evaluación sensorial de aceptabilidad en hamburguesas. **NC/CS:** hamburguesa cruda elaborada con grasa de cerdo; **MF/GDE:** hamburguesa con sustitución parcial de grasa animal por GDE; **LF/GDE:** hamburguesa con sustitución total de grasa animal por GDE.

En base a los resultados obtenidos por los procesos de reformulación basados en la reducción y mejora del perfil lipídico para adecuarse a las recomendaciones de ingesta de AG. Se puede concluir que la incorporación de GDE como análogos de grasa no conlleva a consecuencias sensoriales negativas en las hamburguesas. Sin embargo, la incorporación de

DE en salchichas tipo frankfurt puede originar a algunas limitaciones organolépticas, por lo que se hace necesario estudiar en un futuro las causas que las pueden ocasionar para así poder limitar su efecto y facilitar el uso de dichos sistemas en la reformulación de productos.

Conclusiones

6. CONCLUSIONES

En relación al desarrollo y obtención de emulsiones dobles como sistemas de entrega de compuestos bioactivos (primer objetivo específico) se puede concluir que:

1. Las emulsiones dobles (DE, $W_1/O/W_2$) si bien constituyen una estrategia adecuada para vehiculizar compuestos bioactivos, tales como ácidos grasos insaturados e hidroxitirosol, por su naturaleza más bien líquida presentan algunas limitaciones para su utilización como sustitutos de grasa en matrices cárnicas.
2. Las posibilidades de dotar a las $W_1/O/W_2$ de una naturaleza sólida más próxima a la de la grasa animal, habitualmente empleada en productos cárnicos, están asociadas a la aplicación de estrategias de estructuración, bien basadas en la modificación de la fase lipídica mediante la incorporación de mono- y di-acilglicéridos o bien fundamentadas en la implementación de proceso de gelificación en frío. En este sentido, la utilización de mezclas de mono- y di-acilglicéridos resultó ser poco efectiva para su uso como sustitutos de grasa.
3. La utilización de procedimientos de gelificación en frío, basados en el empleo de combinaciones de gelatina y transglutaminasa de origen microbiano aplicada en la fase acuosa externa, proporciona a la $W_1/O/W_2$ gelificada (GDE) características estructurales con interesantes posibilidades para su utilización como sustitutos de grasa animal en procesos de reformulación de productos cárnicos.
4. En las condiciones estudiadas se puede afirmar que tanto las DE como las GDE presentan una estabilidad de procesado y conservación suficiente para su uso potencial como ingredientes funcionales. En relación a la estabilidad oxidativa de las dobles emulsiones y el papel que la presencia de HXT ejerce sobre la misma, esta se ve en gran medida condicionada por la naturaleza y proceso de formación y gelificación de las emulsiones. En tal sentido, el efecto antioxidante que ejerce el HXT sobre el sistema (fase oleosa de la $W_1/O/W_2$) es menor cuando se aplican estrategias de hidrogelificación en la fase externa de la emulsión.

En relación a la utilización de DE y GDE en el desarrollo de productos cárnicos funcionales se puede concluir que:

5. La utilización de estrategias de reformulación de productos cárnicos basadas en la sustitución total de la grasa animal por emulsiones, $W_1/O/W_2$, resulta adecuada para la obtención de salchichas tipo frankfurt funcionales, en base a un contenido lipídico mejorado. Tal planteamiento, además de posibilitar la reducción del nivel de grasa, ha permitido dotar a dicho producto de concentraciones limitadas de ácidos grasos saturados (10% del total de ácidos grasos), así como cantidades muy relevantes de ácidos grasos poliinsaturados (70% del total de ácidos grasos), incluyendo ácidos grasos poliinsaturados de la serie n-3 (5,3 g/100 g). Complementariamente a dicha estrategia, la incorporación de DE, si bien condiciona diversas características de las salchichas tipo frankfurt convencionales, permite el desarrollo de productos con adecuada viabilidad tecnológica y sensorial.
6. El proceso de reformulación encaminado al desarrollo de hamburguesas funcionales, basado en la sustitución de grasa animal por una emulsión doble gelificada (GDE) de aceite de perilla, permite la obtención de productos donde se simultanea la reducción de niveles importantes de grasa (de hasta el 30%) con la incorporación de elevadas cantidades de ácidos grasos poliinsaturados de la serie n-3, (superiores a 2g/100 g de ácidos grasos n-3) así como de, al menos, 2,5 mg de HXT/100g de producto. Dicha estrategia, aunque condiciona las propiedades tecnológicas y sensoriales, permite la obtención de hamburguesas con adecuada viabilidad tecnológica y sensorial.
7. Las novedosas estrategias de reformulación llevadas a cabo, basadas en el empleo de emulsiones dobles/gelificadas permiten la obtención de salchichas tipo frankfurt y hamburguesas, que presentan una composición lipídica más acorde con las recomendaciones de ingesta de ácidos grasos establecidas. En tal sentido, la modificación realizada posibilita la consideración de ambos productos como funcionales, en tanto en cuanto, concurren las condiciones necesarias para mostrar diversas declaraciones nutricionales y de propiedades saludables, en el marco de lo establecido en el Reglamento (CE) 1924/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos.

Conclusión general

La formación de emulsiones dobles y de emulsiones dobles estructuradas, mediante procesos de hidrogelificación de la fase acuosa externa, abre nuevas posibilidades en la aplicación de las estrategias tecnológicas de diseño y obtención de sustitutos de grasa animal. Su composición (presencia de compuestos bioactivos) y estructura compartimentalizada capaz de dotarles de actividad multifuncional, además de su naturaleza sólida próxima a la de la grasa animal en el caso de las emulsiones dobles gelificadas, ofrece nuevas posibilidades de reformulación de productos cárnicos funcionales, como las salchichas tipo frankfurt y hamburguesas. Tales características sitúan a los nuevos materiales de entrega de lípidos en una posición excepcionalmente apropiada para su empleo en múltiples aplicaciones en el marco de la alimentación funcional.

Bibliografía

7. BIBLIOGRAFÍA

Aditya, N. P., Aditya, S., Yang, H., Kim, H. W., Park, S. O. and Ko, S. (2015). "Co-delivery of hydrophobic curcumin and hydrophilic catechin by a water-in-oil-in-water double emulsion." Food Chemistry **173**: 7-13.

Alejandre, M., Poyato, C., Ansorena, D. and Astiasaran, I. (2016). "Linseed oil gelled emulsion: A successful fat replacer in dry fermented sausages." Meat Science **121**: 107-113.

Alexander, D. D., Weed, D. L., Cushing, C. A. and Lowe, K. A. (2011). "Meta-analysis of prospective studies of red meat consumption and colorectal cancer." European Journal of Cancer Prevention **20**(4): 293-307.

Alvarez, D., Delles, R. M., Xiong, Y. L., Castillo, M., Payne, F. A. and Laencina, J. (2011). "Influence of canola-olive oils, rice bran and walnut on functionality and emulsion stability of frankfurters." Lwt-Food Science and Technology **44**(6): 1435-1442.

AOAC (2005). AOAC. (2005). Official methods of analysis (18th ed). Maryland, USA: Association of Official Analytical Chemistry. Maryland, USA, Association of Official Analytical Chemistry.

Arihara, K. (2006). "Strategies for designing novel functional meat products." Meat Science **74**(1): 219-229.

Aro, A., Mannisto, S., Salminen, I., Ovaskainen, M. L., Kataja, V. and Uusitupa, M. (2000). "Inverse association between dietary and serum conjugated linoleic acid and risk of breast cancer in postmenopausal women." Nutrition and Cancer-an International Journal **38**(2): 151-157.

Arvanitoyannis, I. S., Bloukas, J. G. and Pappa, I. C. (2000). "Optimization of salt, olive oil and pectin level for low-fat frankfurters produced by replacing pork backfat with olive oil." Meat Science **56**(1): 81-88.

Aspelund, T., Gudnason, V., Magnusdottir, B. T., Andersen, K., Sigurdsson, G., Thorsson, B., Steingrimsdottir, L., Critchley, J., Bennett, K., O'Flaherty, M. and Capewell, S. (2010). "Analysing the Large Decline in Coronary Heart Disease Mortality in the Icelandic Population Aged 25-74 between the Years 1981 and 2006." Plos One **5**(11).

Ayerza, R. and Coates, W. (2005). "Ground chia seed and chia oil effects on plasma lipids and fatty acids in the rat." Nutrition Research **25**(11): 995-1003.

Ayo, J., Carballo, J., Serrano, J., Olmedilla-Alonso, B., Ruiz-Capillas, C. and Jiménez-Colmenero, F. (2007). "Effect of total replacement of pork backfat with walnut on the nutritional profile of frankfurters." Meat Science **77**(2): 173-181.

Azadbakht, L. and Esmailzadeh, A. (2009). "Red Meat Intake Is Associated with Metabolic Syndrome and the Plasma C-Reactive Protein Concentration in Women." The Journal of Nutrition **139**(2): 335-339.

Babio, N., Balanza, R., Basulto, J., Bullo, M. and Salas-Salvado, J. (2010). "Dietary fibre: influence on body weight, glycemic control and plasma cholesterol profile." Nutrición Hospitalaria **25**(3): 327-340.

Babji, A. S., Alina, A. R., Seri Chempaka, M. Y., Sharmini, T., Basker, R. and Yap, S. L. (1998). "Replacement of animal fat with fractionated and partially hydrogenated palm oil in beef burgers." International Journal of Food Science and Nutritional **49**(5): 327-332.

Bastida, S., Sanchez-Muniz, F. J., Olivero, R., Perez-Olleros, L., Ruiz-Roso, B. and Jiménez-Colmenero, F. (2009). "Antioxidant activity of Carob fruit extracts in cooked pork meat systems during chilled and frozen storage." Food Chemistry **116**(3): 748-754.

BEDCA. (2010). "Base de datos española de composición de alimentos." from <http://www.bedca.net/bdpub/index.php>.

Belitz, H. D., Grosch, W. and Schieberle, P. (2009) 3 ed. Food Chemistry. Springer Science & Business Media.

Belury, M. A. (2002a). "Dietary conjugated linoleic acid in health: Physiological effects and mechanisms of action." Annual Review of Nutrition **22**: 505-531.

Belury, M. A. (2002b). "Inhibition of carcinogenesis by conjugated linoleic acid: Potential mechanisms of action." Journal of Nutrition **132**(10): 2995-2998.

Bendini, A., Cerretani, L., Carrasco-Pancorbo, A., Gomez-Caravaca, A. M., Segura-Carretero, A., Fernandez-Gutierrez, A. and Lercker, G. (2007). "Phenolic molecules in virgin olive oils: a survey of their sensory properties, health effects, antioxidant activity and analytical methods. An overview of the last decade." Molecules **12**(8): 1679-1719.

Benichou, A., Aserin, A. and Garti, N. (2001). "Polyols, High Pressure, and Refractive Indices Equalization for Improved Stability of W/O Emulsions for Food Applications." Journal of Dispersion Science and Technology **22**(2-3): 269-280.

Benichou, A., Aserin, A. and Garti, N. (2007). "W/O/W double emulsions stabilized with WPI-polysaccharide complexes." Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects **294**(1-3): 20-32.

Biesalski, H. K. (2005). "Meat as a component of a healthy diet - are there any risks or benefits if meat is avoided in the diet?" Meat Science **70**(3): 509-524.

Bligh, E. G. and Dyer, W. J. (1959). "A rapid method of total lipid extraction and purification." Canadian Journal of Biochemistry and Physiology **37**(8): 911-917.

Bloukas, J. G., Fournitzis, G. C. and Panera, E. D. (1997). "Sodium Lactate and Protective Culture Effects on Quality Characteristics and Shelf-life of Low-fat Frankfurters Produced with Olive Oil." Meat Science **45**(2): 223-238.

Bohme, B., Symmank, C. and Rohm, H. (2016). "Physical and sensory properties of chocolate made with lecithin of different origin." European Journal of Lipid Science and Technology **118**(12): 1839-1845.

Boldyrev, A. A., Aldini, G. and Derave, W. (2013). "Physiology and pathophysiology of carnosine." Physiological Reviews **93**(4): 1803-1845.

Bonanome, A. and Grundy, S. M. (1988). "Effect of dietary stearic-acid on plasma-cholesterol and lipoprotein levels." New England Journal of Medicine **318**(19): 1244-1248.

Bonnet, M., Cansell, M., Berkaoui, A., Ropers, M. H., Anton, M. and Leal-Calderon, F. (2009). "Release rate profiles of magnesium from multiple W/O/W emulsions." Food Hydrocolloids **23**(1): 92-101.

Bonnet, M., Cansell, M., Monteil, J., Placin, F., Leal-Calderon, F. and Anton, M. (2010a). "Influence of the oil globule fraction on the release rate profiles from multiple W/O/W emulsions." Colloids and Surfaces B: Biointerfaces **78**(1): 44-52.

- Bonnet, M., Cansell, M., Placin, F., David-Briand, E., Anton, M. and Leal-Calderon, F. (2010b). "Influence of ionic complexation on release rate profiles from multiple water-in-oil-in-water (W/O/W) emulsions." Journal of Agriculture, Food and Chemistry **58**(13): 7762-7769.
- Bou, R., Cofrades, S. and Jiménez-Colmenero, F. (2014). "Physicochemical properties and riboflavin encapsulation in double emulsions with different lipid sources." LWT - Food Science and Technology **59**(2): 621-628.
- Bourne, M. C. (1978). "Texture profile analysis." Food Technology **32**(7).
- Bouvard, V., Loomis, D., Guyton, K. Z., Grosse, Y., Ghissassi, F. E., Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N., Mattock, H. and Straif, K. (2015). "Carcinogenicity of consumption of red and processed meat." The Lancet Oncology **16**(16): 1599-1600.
- Brenna, J. T., Salem Jr, N., Sinclair, A. J. and Cunnane, S. C. (2009). " α -Linolenic acid supplementation and conversion to n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in humans." Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids **80**(2-3): 85-91.
- Brewer, M. S. (2012). "Reducing the fat content in ground beef without sacrificing quality: A review." Meat Science **91**(4): 385-395.
- Brückner, M., Bade, M., Kunz, B. and (2007). "Investigations into the stabilization of a volatile aroma compound using a combined emulsification and spray drying process." European Food Research Technology **226**(1-2): 137-146.
- Burdge, G. C. (2006). "Metabolism of alpha-linolenic acid in humans." Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids **75**(3): 161-168.
- Campese, V. M. (1994). "Salt sensitivity in hypertension - renal and cardiovascular implications." Hypertension **23**(4): 531-550.
- Carballo, J., Fernández, P., Barreto, G., Solas, M. T. and Jiménez-Colmenero, F. (1996). "Characteristics of High-and Low-Fat Bologna Sausages as Affected by Final Internal Cooking Temperature and Chilling Storage." Journal of the Science of Food and Agriculture **72**(1): 40-48.
- Carrillo-Navas, H., Cruz-Olivares, J., Varela-Guerrero, V., Alamilla-Beltrán, L., Vernon-Carter, E. J. and Pérez-Alonso, C. (2012). "Rheological properties of a double emulsion nutraceutical system incorporating chia essential oil and ascorbic acid stabilized by carbohydrate polymer-protein blends." Carbohydrate Polymers **87**(2): 1231-1235.
- Castro-Gomez, P., Garcia-Serrano, A., Visioli, F. and Fontecha, J. (2015). "Relevance of dietary glycerophospholipids and sphingolipids to human health." Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids **101**: 41-51.
- Chao, A., Thun, M. J., Connell, C. J., McCullough, M. L., Jacobs, E. J., Flanders, W. D., Rodriguez, C., Sinha, R. and Calle, E. E. (2005). "Meat consumption and risk of colorectal cancer." Jama-Journal of the merican Medical Association **293**(2): 172-182.
- Chen, L., Remondetto, G. E. and Subirade, M. (2006). "Food protein-based materials as nutraceutical delivery systems." Trends in Food Science & Technology **17**(5): 272-283.
- Cheong, L.-Z., Zhang, H., Nersting, L., Jensen, K., Haagenzen, J. A. J. and Xu, X. (2010). "Physical and sensory characteristics of pork sausages from enzymatically modified blends of lard and rapeseed oil during storage." Meat Science **85**(4): 691-699.
- Choi, S. J., Decker, E. A. and McClements, D. J. (2009). "Impact of iron encapsulation within the interior aqueous phase of water-in-oil-in-water emulsions on lipid oxidation." Food Chemistry **116**(1): 271-276.

- Choi, Y.-S., Kim, Y.-B., Hwang, K.-E., Song, D.-H., Ham, Y.-K., Kim, H.-W., Sung, J.-M. and Kim, C.-J. (2016). "Effect of apple pomace fiber and pork fat levels on quality characteristics of uncured, reduced-fat chicken sausages." Poultry Science **95**(6): 1465-1471.
- CIE (1995). Industrial colour-difference evaluation. Publication no. 116. CIE. CIE Central Bureau, Vienna.
- CIIC (2015). Carcinogenicidad del consumo de carne roja y de la carne procesada. OMS. Lyon, OMS.
- Claus, J. R. and Hunt, M. C. (1991). "Low-fat, high added-water bologna formulated with texture-modifying ingredients." Journal of Food Science **56**(3): 643-&.
- Co, E. D. and Marangoni, A. G. (2012). "Organogels: An Alternative Edible Oil-Structuring Method." Journal of the American Oil Chemists Society **89**(5): 749-780.
- Cofrades, S., Antoniou, I., Solas, M. T., Herrero, A. M. and Jiménez-Colmenero, F. (2013). "Preparation and impact of multiple (water-in-oil-in-water) emulsions in meat systems." Food Chemistry **141**(1): 338-346.
- Cofrades, S., Ayo, J., Serrano, A., Carballo, J. and Jiménez-Colmenero, F. (2006). "Walnut, microbial transglutaminase and chilling storage time effects on salt-free beef batter characteristics." European Food Research and Technology **222**(3-4): 458-466.
- Cofrades, S., Bou, R., Flaiz, L., Garcimartín, A., Benedí, J., Mateos, R., Sánchez-Muniz, F., Olivero-David, R. and Jiménez Colmenero, F. (2017). "Bioaccessibility of hydroxytyrosol and n-3 fatty acids as affected by the delivery system: simple, double and gelled double emulsions." Journal Food Science Technology-Mysore **54**(7) 1785-1793.
- Cofrades, S., Bou, R., Gomez-Nieto, B., Procopio, J. R., Errabi, A. and Jiménez-Colmenero, F. (2016). "Physicochemical properties and encapsulation of silicon in double emulsions for healthier food applications." Journal of Food Science and Technology-Mysore **53**(11): 3884-3893.
- Cofrades, S., Guerra, M. A., Carballo, J., Fernández-Martín, F. and Jiménez Colmenero, F. (2000). "Plasma protein and soy fiber content effect on bologna sausage properties as influenced by fat level." Journal of Food Science **65**(2): 281-287.
- Cofrades, S., Jiménez-Colmenero, F., Fernandez-Martin, F. and López-López, I. (2009). "Influence of adding Sea Spaghetti seaweed and replacing the animal fat with olive oil or a konjac gel on pork meat batter gelation. Potential protein/alginate association." Meat Science **83**(2): 209-217.
- Cofrades, S., Salcedo-Sandoval, L., Delgado-Pando, G., López-López, I., Ruiz-Capillas, C. and Jiménez-Colmenero, F. (2011a). "Antioxidant activity of hydroxytyrosol in frankfurters enriched with n-3 polyunsaturated fatty acids." Food Chemistry **129**(2): 429-436.
- Cofrades, S., Salcedo-Sandoval, L. S., Delgado-Pando, G., López-López, I., Ruiz-Capillas, C. and Jiménez-Colmenero, F. (2011b). "Antioxidant activity of hydroxytyrosol in frankfurters enriched with n-3 polyunsaturated fatty acids." Food Chemistry **129**(2): 429-436.
- Cross, A. J., Leitzmann, M. F., Gail, M. H., Hollenbeck, A. R., Schatzkin, A. and Sinha, R. (2007). "A prospective study of red and processed meat intake in relation to cancer risk." Plos Medicine **4**(12): 1973-1984.
- de Benoist, B. (2008). "Conclusions of a WHO Technical Consultation on folate and vitamin B12 deficiencies." Food and nutrition bulletin **29**(2_suppl1): S238-S244.
- De Jong, G. A. H. and Koppelman, S. J. (2002). "Transglutaminase catalyzed reactions: Impact on food applications." Journal of Food Science **67**(8): 2798-2806.

- Decker, E. A. and Park, Y. (2010). "Healthier meat products as functional foods." Meat Science **86**(1): 49-55.
- DeFronzo, R. A. and Ferrannini, E. (1991). "Insulin resistance: a multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease." Diabetes care **14**(3): 173-194.
- Delgado-Pando, G., Cofrades, S., Rodríguez-Salas, L., Jiménez-Colmenero, F. and (2011). "A healthier oil combination and konjac gel as functional ingredients in low-fat pork liver pâté." Meat Science **88**(2): 241-248.
- Delgado-Pando, G., Cofrades, S., Ruiz-Capillas, C. and Jiménez-Colmenero, F. (2010a). "Healthier lipid combination as functional ingredient influencing sensory and technological properties of low-fat frankfurters." European Journal of Lipid Science and Technology **112**(8): 859.
- Delgado-Pando, G., Cofrades, S., Ruiz-Capillas, C., Teresa Solas, M. and Jiménez-Colmenero, F. (2010b). "Healthier lipid combination oil-in-water emulsions prepared with various protein systems: an approach for development of functional meat products." European Journal of Lipid Science and Technology **112**(7): 791-801.
- Delgado-Pando, G., Cofrades, S., Ruiz-Capillas, C., Triki, M. and Jiménez Colmenero, F. (2012a). "Low-fat pork liver pâtés enriched with n-3 PUFA/konjac gel: dynamic rheological properties and technological behaviour during chill storage." Meat Science **92**(1): 44-52.
- Delgado-Pando, G., Cofrades, S., Ruiz-Capillas, C., Triki, M. and Jiménez-Colmenero, F. (2012b). "Enriched n – 3 PUFA/konjac gel low-fat pork liver pâté: Lipid oxidation, microbiological properties and biogenic amine formation during chilling storage." Meat Science **92**(4): 762-767.
- Dickinson, E. (1992). "An introduction to food colloids." Oxford university press.
- Dickinson, E. (2010). "Food emulsions and foams: Stabilization by particles." Current Opinion in Colloid & Interface Science **15**(1-2): 40-49.
- Dickinson, E. (2011). "Double Emulsions Stabilized by Food Biopolymers." Food Biophysics **6**(1): 1-11.
- Dickinson, E. (2012). "Emulsion gels: The structuring of soft solids with protein-stabilized oil droplets." Food Hydrocolloids **28**(1): 224-241.
- Dickinson, E. (2015). Colloids in Food: Ingredients, Structure, and Stability. Annual Review of Food Science and Technology, Vol 6. M. P. Doyle and T. R. Klaenhammer. Palo Alto, Annual Reviews. **6**: 211-233.
- Dickinson, E. and Stainsby, G. (1982). Colloids in food., Applied Science Publishers.
- Diplock, A. T., Aggett, P. J., Ashwell, M., Bornet, F., Fern, E. B. and Roberfroid, M. B. (1999). "Scientific concepts of functional foods in Europe consensus document." British Journal of Nutrition **81**(4): S1-S27.
- Domazakies, E. S. (2005). Method for the production of meat products from entire muscular tissue and direct integration of olive oil. Great Britain.
- Dubois, V., Breton, S., Linder, M., Fanni, J. and Parmentier, M. (2007a). "Fatty acid profiles of 80 vegetable oils with regard to their nutritional potential." European Journal of Lipid Science and Technology **109**(7): 710-732.
- Dubois, V., Parmentier, M., Fanni, J., Breton, S. and Linder, M. (2007b). "Fatty acid profiles of 80 vegetable oils with regard to their nutritional potential." European Journal of Lipid Science Technology **109**(7): 710-732.

Dwyer, S. P. O., Beirne, D. O., Eidhin, D. N. and Kennedy, B. T. O. (2012). "Effects of Green Tea Extract and alpha-Tocopherol on the Lipid Oxidation Rate of Omega-3 Oils, Incorporated into Table Spreads, Prepared using Multiple Emulsion Technology." Journal of Food Science **77**(12): N58-N65.

Dzudie, T., Kouebou, C. P., Essia-Ngang, J. J. and Mbofung, C. M. F. (2004). "Lipid sources and essential oils effects on quality and stability of beef patties." Journal of Food Engineering **65**(1): 67-72.

EFSA (2009). "Opinion on the safety of 'Chia seeds (*Salvia hispanica* L.) and ground whole Chia seeds' as a food ingredient." EFSA Journal **7**(4): 996-n/a.

EFSA (2010). "Panel on Dietetic Products, Nutrition Allergies, Scientific Opinion on Dietary Reference Values for fats, including saturated fatty acids, polyunsaturated fatty acids, monounsaturated fatty acids, trans fatty acids, and cholesterol." EFSA Journal **8**(3): 1461-n/a.

EFSA (2011). Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to docosahexaenoic acid (DHA), eicosapentaenoic acid (EPA) and brain, eye and nerve development (ID 501, 513, 540), maintenance of normal brain function (ID 497, 501, 510, 513, 519, 521, 534, 540, 688, 1323, 1360, 4294), maintenance of normal vision (ID 508, 510, 513, 519, 529, 540, 688, 2905, 4294), maintenance of normal cardiac function (ID 510, 688, 1360), "maternal health; pregnancy and nursing" (ID 514), "to fulfil increased omega-3 fatty acids need during pregnancy" (ID 539), "skin and digestive tract epithelial cells maintenance" (ID 525), enhancement of mood (ID 536), "membranes cell structure" (ID 4295), "anti-inflammatory action" (ID 4688) and maintenance of normal blood LDL-cholesterol concentrations (ID 4719) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006, 8 April 2011.

EFSA (2014). "Scientific Opinion on Dietary Reference Values for selenium." EFSA Journal **12**(10): 3846-n/a.

EFSA (2016). Dietary reference values for potassium. EFSA Journal. Parma, Italy, Panel on Dietetic Products, Nutrition Allergies, **14**: e04592-n/a.

Elias, R. J., Kellerby, S. S. and Decker, E. A. (2008). "Antioxidant activity of proteins and peptides." Critical Reviews in Food Science and Nutrition **48**(5): 430-441.

Escudero, E., Aristoy, M. C., Nishimura, H., Arihara, K. and Toldra, F. (2012a). "Antihypertensive effect and antioxidant activity of peptide fractions extracted from Spanish dry-cured ham." Meat Science **91**(3): 306-311.

Escudero, E., Mora, L., Fraser, P. D., Aristoy, M. C., Arihara, K. and Toldra, F. (2013). "Purification and Identification of antihypertensive peptides in Spanish dry-cured ham." Journal of Proteomics **78**: 499-507.

Escudero, E., Toldra, F., Sentandreu, M. A., Nishimura, H. and Arihara, K. (2012b). "Antihypertensive activity of peptides identified in the in vitro gastrointestinal digest of pork meat." Meat Science **91**(3): 382-384.

Eslami, P., Davarpanah, L. and Vahabzadeh, F. (2017). "Encapsulating role of beta-cyclodextrin in formation of pickering water-in-oil-in-water (W-1/O/W-2) double emulsions containing *Lactobacillus delbrueckii*." Food Hydrocolloids **64**: 133-148.

Esposito, K., Marfella, R., Ciotola, M., Di Palo, C., Giugliano, F., Giugliano, G., D'Armiento, M., D'Andrea, F. and Giugliano, D. (2004). "Effect of a Mediterranean-style diet on endothelial dysfunction and markers of vascular inflammation in the metabolic syndrome - A randomized trial." Jama-Journal of the American Medical Association **292**(12): 1440-1446.

Estruch, R., Ros, E., Salas-Salvado, J., Covas, M. I., Corella, D., Aros, F., Gomez-Gracia, E., Ruiz-Gutierrez, V., Fiol, M., Lapetra, J., Lamuela-Raventos, R. M., Serra-Majem, L., Pinto, X., Basora, J., Munoz, M. A., Sorli, J. V., Martinez, J. A., Martinez-Gonzalez, M. A. and Investigators, P. S. (2013). "Primary Prevention

of Cardiovascular Disease with a Mediterranean Diet." New England Journal of Medicine **368**(14): 1279-1290.

Faridi, E. A., Jafari, S. M. and Assadpour, E. (2017). "Preparation of a multiple emulsion based on pectin-whey protein complex for encapsulation of saffron extract nanodroplets." Food Chemistry **221**: 1962-1969.

Fechner, A., Knoth, A., Scherze, I. and Muschiolik, G. (2007). "Stability and release properties of double-emulsions stabilised by caseinate–dextran conjugates." Food Hydrocolloids **21**(5-6): 943-952.

Fennema, O. R. (1996). "Food Chemistry, 5^o Ed." CRC Press.

Food Drink (2016). Data & trends EU food and drink industry. F. a. d. Europe. Brussels, Food and drink Europe.

Frasch-Melnik, S., Spyropoulos, F. and Norton, I. T. (2010). "W1/O/W2 double emulsions stabilised by fat crystals--formulation, stability and salt release." Journal Colloid Interface Sci **350**(1): 178-185.

Fujii, T., Takaoka, M., Muraoka, T., Kurata, H., Tsuruoka, N., Ono, H., Kiso, Y., Tanaka, T. and Matsumura, Y. (2003). "Preventive effect of L-carnosine on ischemia/reperfusion-induced acute renal failure in rats." European journal of pharmacology **474**(2): 261-267.

Fuke, G. and Nornberg, J. L. (2017). "Systematic evaluation on the effectiveness of conjugated linoleic acid in human health." Critical Reviews in Food Science and Nutrition **57**(1): 1-7.

Fung, T. T., Schulze, M., Manson, J. E., Willett, W. C. and Hu, F. B. (2004). "Dietary patterns, meat intake, and the risk of type 2 diabetes in women." Archives of Internal Medicine **164**(20): 2235-2240.

Ganhão, R., Estévez, M., Armenteros, M. and Morcuende, D. (2013). "Mediterranean berries as inhibitors of lipid oxidation in porcine burger patties subjected to cooking and chilled storage." Journal of Integrative Agriculture **12**(11): 1982-1992.

Garcia, M. L., Calvo, M. M. and Selgas, M. D. (2009). "Beef hamburgers enriched in lycopene using dry tomato peel as an ingredient." Meat Science **83**(1): 45-49.

Garcia-Iniguez de Ciriano, M., Rehecho, S., Isabel Calvo, M., Yolanda Caverio, R., Navarro, I., Astiasaran, I. and Ansorena, D. (2010). "Effect of lyophilized water extracts of *Melissa officinalis* on the stability of algae and linseed oil-in-water emulsion to be used as a functional ingredient in meat products." Meat Science **85**(2): 373-377.

Gardner, C. D. and Kraemer, H. C. (1995). "Monounsaturated versus polyunsaturated dietary-fat and serum-lipids - a metaanalysis." Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology **15**(11): 1917-1927.

Garg, M. L., Wood, L. G., Singh, H. and Moughan, P. J. (2006). "Means of delivering recommended levels of long chain n-3 polyunsaturated fatty acids in human diets." Journal of Food Science **71**(5): R66-R71.

Garti, N. (1997a). "Double emulsions - Scope, limitations and new achievements." Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects **123**: 233-246.

Garti, N. (1997b). "Progress in stabilization and transport phenomena of double emulsions in food applications." Food Science and Technology-Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie **30**(3): 222-235.

Garti, N. and Aserin, A. (1998). Double emulsions stabilized by macromolecular surfactants. Advances in Colloid and Interface Science, 65, 37-69.

Ghosh, S., Pradhan, M., Patel, T., Haj-shafiei, S. and Rousseau, D. (2015). "Long-term stability of crystal-stabilized water-in-oil emulsions." Journal of Colloid and Interface Science **460**: 247-257.

- Ghosh, S. and Rousseau, D. (2012). "Triacylglycerol Interfacial Crystallization and Shear Structuring in Water-in-Oil Emulsions." Crystal Growth & Design **12**(10): 4944-4954.
- Giese, J. (1992). "Developing low-fat meat-products." Food Technology **46**(4): 100-108.
- Gil, A. (2010). Tratado de nutrición : Bases fisiológicas y bioquímicas de la nutrición, Médica Paramericana.
- Giovannucci, E., Rimm, E. B., Stampfer, M. J., Colditz, G. A., Ascherio, A. and Willett, W. C. (1994). "Intake of fat, meat, and fiber in relation to risk of colon-cancer in men." Cancer Research **54**(9): 2390-2397.
- Grasso, S., Brunton, N. P., Lyng, J. G., Lalor, F. and Monahan, F. J. (2014). "Healthy processed meat products - Regulatory, reformulation and consumer challenges." Trends in Food Science & Technology **39**(1): 4-17.
- Guàrdia, M. D., Guerrero, L., Gelabert, J., Gou, P. and Arnau, J. (2006). "Consumer attitude towards sodium reduction in meat products and acceptability of fermented sausages with reduced sodium content." Meat Science **73**(3): 484-490.
- Gujral, H. S., Kaur, A., Singh, N. and Sodhi, N. S. (2002). "Effect of liquid whole egg, fat and textured soy protein on the textural and cooking properties of raw and baked patties from goat meat." Journal of Food Engineering **53**(4): 377-385.
- Gunstone, F. (2011). "Vegetable Oils in Food Technology: Composition, Properties and Uses ". John Wiley & Sons.
- Haak, L., Raes, K. and De Smet, S. (2009). "Effect of plant phenolics, tocopherol and ascorbic acid on oxidative stability of pork patties." Journal of the Science of Food and Agriculture **89**(8): 1360-1365.
- Hardy, G. (2000). "Nutraceuticals and functional foods: Introduction and meaning." Nutrition **16**(7-8): 688-689.
- Hegsted, D. M., McGandy, R. B., Myers, M. L. and Stare, F. J. (1965). "Quantitative effects of dietary fat on serum cholesterol in man." American Journal of Clinical Nutrition **17**(5): 281-&.
- Hemar, Y., Cheng, L. J., Oliver, C. M., Sanguansri, L. and Augustin, M. (2010). "Encapsulation of resveratrol using water-in-oil-in-water double emulsions." Food Biophysics **5**(2): 120-127.
- Hernandez-Marin, N. Y., Lobato-Calleros, C., Roman-Guerrero, A., Alvarez-Ramirez, J. and Vernon-Carter, E. J. (2016). "Physical properties and release behaviour of caffeine multiple emulsions stabilised by binary or ternary biopolymer soluble complexes under acid, bile and yogurt storage conditions." Food Hydrocolloids **58**: 42-48.
- Herrero, A. M., Carmona, P., Pintado, T., Jiménez-Colmenero, F. and Ruiz-Capillas, C. (2011). "Olive oil-in-water emulsions stabilized with caseinate: Elucidation of protein-lipid interactions by infrared spectroscopy." Food Hydrocolloids **25**(1): 12-18.
- Herrero, A. M., Carmona, P., Pintado, T., Jiménez-Colmenero, F. and Ruiz-Capillas, C. (2012). "Lipid and protein structure analysis of frankfurters formulated with olive oil-in-water emulsion as animal fat replacer." Food Chemistry **135**(1): 133-139.
- Herrero, A. M., Ruiz-Capillas, C., Jiménez-Colmenero, F. and Carmona, P. (2014). "Raman Spectroscopic Study of Structural Changes upon Chilling Storage of Frankfurters Containing Olive Oil Bulking Agents As Fat Replacers." Journal of Agricultural and Food Chemistry **62**(25): 5963-5971.
- Hipkiss, A. R. and Brownson, C. (2000). "A possible new role for the anti-ageing peptide carnosine." Cellular and Molecular Life Sciences **57**(5): 747-753.

- Howard, B. V., Hannah, J. S., Heiser, C. C., Jablonski, K. A., Paidi, M. C., Alarif, L., Robbins, D. C. and Howard, W. J. (1995). "Polyunsaturated fatty-acids result in greater cholesterol-lowering and less triacylglycerol elevation than do monounsaturated fatty-acids in a dose-response comparison in a multiracial study-group." American Journal of Clinical Nutrition **62**(2): 392-402.
- Howell, W. H., McNamara, D. J., Tosca, M. A., Smith, B. T. and Gaines, J. A. (1997). "Plasma lipid and lipoprotein responses to dietary fat and cholesterol: a meta-analysis." The American Journal of Clinical Nutrition **65**(6): 1747-1764.
- Hu, F. B., van Dam, R. M. and Liu, S. (2001). "Diet and risk of Type II diabetes: the role of types of fat and carbohydrate." Diabetologia **44**(7): 805-817.
- Hur, S. J., Jin, S. K. and Kim, I. S. (2008). "Effect of extra virgin olive oil substitution for fat on quality of pork patty." Journal of the Science of Food and Agriculture **88**(7): 1231-1237.
- INE (2015). Encuesta industrial de Empresas 2014. I. N. d. Estadística.
- Jiménez Colmenero, F. (2013). "Health claims in meat based functional foods." Annals of Nutrition and Metabolism **63**: 150-150.
- Jiménez-Alvarado, R., Beristain, C. I., Medina-Torres, L., Roman-Guerrero, A. and Vernon-Carter, E. J. (2009). "Ferrous bisglycinate content and release in W(1)/O/W(2) multiple emulsions stabilized by protein-polysaccharide complexes." Food Hydrocolloids **23**(8): 2425-2433.
- Jiménez-Colmenero, F. (1996). "Technologies for developing low-fat meat products." Trends in Food Science & Technology **7**(2): 41-48.
- Jiménez-Colmenero, F. (2007). "Healthier lipid formulation approaches in meat-based functional foods. Technological options for replacement of meat fats by non-meat fats." Trends in Food Science & Technology **18**(11): 567-578.
- Jiménez-Colmenero, F. (2013a). "Multiple emulsions; bioactive compounds and functional foods." Nutrición Hospitalaria **28**(5): 1413-1421.
- Jiménez-Colmenero, F. (2013b). "Potential applications of multiple emulsions in the development of healthy and functional foods." Food Research International **52**(1): 64-74.
- Jiménez-Colmenero, F., Carballo, J. and Cofrades, S. (2001). "Healthier meat and meat products: their role as functional foods." Meat Science **59**(1): 5-13.
- Jiménez-Colmenero, F., Carballo, J. and Solas, M. T. (1995). "The effect of use of freeze-thawed pork on the properties of Bologna sausages with two fat levels." International Journal of Food Science & Technology **30**(3): 335-345.
- Jiménez-Colmenero, F., Herrero, A., Cofrades, S., Ruiz-Capillas, C. and Hui, Y. (2012). "Meat and functional foods." Handbook of meat and meat processing: 225-248.
- Jiménez-Colmenero, F., Salcedo-Sandoval, L., Bou, R., Cofrades, S., Herrero, A. M. and Ruiz-Capillas, C. (2015). "Novel applications of oil-structuring methods as a strategy to improve the fat content of meat products." Trends in Food Science & Technology **44**(2): 177-188.
- Jiménez-Colmenero, F., Triki, M., Herrero, A. M., Rodríguez-Salas, L. and Ruiz-Capillas, C. (2013). "Healthy oil combination stabilized in a konjac matrix as pork fat replacement in low-fat, PUFA-enriched, dry fermented sausages." Lwt-Food Science and Technology **51**(1): 158-163.

- Josquin, N. M., Linssen, J. P. H. and Houben, J. H. (2012). "Quality characteristics of Dutch-style fermented sausages manufactured with partial replacement of pork back-fat with pure, pre-emulsified or encapsulated fish oil." Meat Science **90**(1): 81-86.
- Jung, E. and Joo, N. (2013). "Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) and soybean oil effects on quality characteristics of pork patties studied by response surface methodology." Meat Science **94**(3): 391-401.
- Keenan, D. F., Resconi, V. C., Smyth, T. J., Botinestean, C., Lefranc, C., Kerry, J. P. and Hamill, R. M. (2015). "The effect of partial-fat substitutions with encapsulated and unencapsulated fish oils on the technological and eating quality of beef burgers over storage." Meat Science **107**: 75-85.
- Kerry, J. P. and Kerry, J. F. (2011). Processed meats: improving safety, nutrition and quality. Elsevier.
- Keys, A. and Parlin, R. W. (1966). "Serum cholesterol response to changes in dietary lipids." American Journal of Clinical Nutrition **19**(3): 175-&.
- Kinsella, J. E. and Whitehead, D. M. (1989). "Proteins in whey: chemical, physical, and functional properties." Advances in Food and Nutrition Research **33**: 343-438.
- Knekt, P., Jarvinen, R., Seppanen, R., Pukkala, E. and Aromaa, A. (1996). "Intake of dairy products and the risk of breast cancer." British Journal of Cancer **73**(5): 687-691.
- Kolanowski, W., Swiderski, F. and Berger, S. (1999). "Possibilities of fish oil application for food products enrichment with omega-3 PUFA." International Journal of Food Sciences and Nutrition **50**(1): 39-49.
- Koliandris, A.-L. (2011). Flow behaviour of biopolymer solutions and effect on saltiness perception, University of Nottingham. Tesis doctoral.
- Kong, B. H., Zhang, H. Y. and Xiong, Y. L. (2010). "Antioxidant activity of spice extracts in a liposome system and in cooked pork patties and the possible mode of action." Meat Science **85**(4): 772-778.
- Kotchen, T. A. and McCarron, D. A. (1998). "Dietary electrolytes and blood pressure - A statement for healthcare professionals from the American Heart Association Nutrition Committee." Circulation **98**(6): 613-617.
- Kouvari, M., Notara, V., Kalogeropoulos, N. and Panagiotakos, D. B. (2016). "Diabetes mellitus associated with processed and unprocessed red meat: an overview." International Journal of Food Sciences and Nutrition **67**(7): 735-743.
- Kris-Etherton, P. M., Harris, W. S., Appel, L. J. and Comm, A. H. A. N. (2003). "Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease - New recommendations from the American Heart Association." Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology **23**(2): 151-152.
- Kris-Etherton, P. M. and Nutrition, C. (1999). "Monounsaturated fatty acids and risk of cardiovascular disease." Circulation **100**(11): 1253-1258.
- KrisEtherton, P. M. and Yu, S. M. (1997). "Individual fatty acid effects on plasma lipids and lipoproteins: Human studies." American Journal of Clinical Nutrition **65**(5): 1628-1644.
- Kromhout, D., Menotti, A., Bloemberg, B., Aravanis, C., Blackburn, H., Buzina, R., Dontas, A. S., Fidanza, F., Giaipaoi, S., Jansen, A., Karvonen, M., Katan, M., Nissinen, A., Nedeljkovic, S., Pekkanen, J., Pekkarinen, M., Punsar, S., Rasanen, L., Simic, B. and Toshima, H. (1995). "Dietary saturated and trans-fatty-acids and cholesterol and 25-year mortality from coronary-heart-disease - the 7 countries study." Preventive Medicine **24**(3): 308-315.

- Kukizaki, M. and Goto, M. (2007). "Preparation and evaluation of uniformly sized solid lipid microcapsules using membrane emulsification." Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects **293**(1-3): 87-94.
- Lam, R. S. H. and Nickerson, M. T. (2013). "Food proteins: A review on their emulsifying properties using a structure-function approach." Food Chemistry **141**(2): 975-984.
- Larsson, S. C. and Wolk, A. (2006). "Meat consumption and risk of colorectal cancer: A meta-analysis of prospective studies." International Journal of Cancer **119**(11): 2657-2664.
- Layman, D. K., Clifton, P., Gannon, M. C., Krauss, R. M. and Nuttall, F. Q. (2008). "Protein in optimal health: heart disease and type 2 diabetes." The American Journal of Clinical Nutrition **87**(5): 1571S-1575S.
- Lee, M. R. F., Tweed, J. K. S., Kim, E. J. and Scollan, N. D. (2012). "Beef, chicken and lamb fatty acid analysis - a simplified direct bimethylation procedure using freeze-dried material." Meat Science **92**(4): 863-866.
- Lee, S., Faustman, C., Djordjevic, D., Faraji, H. and Decker, E. A. (2006). "Effect of antioxidants on stabilization of meat products fortified with n – 3 fatty acids." Meat Science **72**(1): 18-24.
- Lee, Y.-t., Hsu, C.-c., Lin, M.-h., Liu, K.-s. and Yin, M.-c. (2005). "Histidine and carnosine delay diabetic deterioration in mice and protect human low density lipoprotein against oxidation and glycation." European Journal of Pharmacology **513**(1): 145-150.
- Leopoldini, M., Russo, N. and Toscano, M. (2011). "The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants." Food Chemistry **125**(2): 288-306.
- Li, B., Jiang, Y., Liu, F., Chai, Z., Li, Y., Li, Y. and Leng, X. (2012). "Synergistic effects of whey protein-polysaccharide complexes on the controlled release of lipid-soluble and water-soluble vitamins in W1/O/W2 double emulsion systems." International Journal of Food Science & Technology **47**(2): 248-254.
- Lim, D. Y., Tyner, A. L., Park, J. B., Lee, J. Y., Choi, Y. H. and Park, J. H. Y. (2005). "Inhibition of colon cancer cell proliferation by the dietary compound conjugated linoleic acid is mediated by the CDK inhibitor p21(CIP1/WAF1)." Journal of Cellular Physiology **205**(1): 107-113.
- Liu, M. N., Huffman, D. L. and Egbert, W. R. (1991). "Replacement of beef fat with partially hydrogenated plant oil in lean ground-beef patties." Journal of Food Science **56**(3): 861-862.
- López-López, I., Bastida, S., Ruiz-Capillas, C., Bravo, L., Larrea, M. T., Sánchez-Muniz, F., Cofrades, S. and Jiménez-Colmenero, F. (2009). "Composition and antioxidant capacity of low-salt meat emulsion model systems containing edible seaweeds." Meat Science **83**(3): 492-498.
- Lopez-Lopez, I., Cofrades, S. and Jiménez-Colmenero, F. (2009). "Low-fat frankfurters enriched with n-3 PUFA and edible seaweed: Effects of olive oil and chilled storage on physicochemical, sensory and microbial characteristics." Meat Science **83**(1): 148-154.
- López-López, I., Cofrades, S., Yakan, A., Solas, M. T. and Jiménez-Colmenero, F. (2010). "Frozen storage characteristics of low-salt and low-fat beef patties as affected by Wakame addition and replacing pork backfat with olive oil-in-water emulsion." Food Research International **43**(5): 1244-1254.
- Lorenzo, J. M., Sineiro, J., Amado, I. R. and Franco, D. (2014). "Influence of natural extracts on the shelf life of modified atmosphere-packaged pork patties." Meat Science **96**(1): 526-534.
- Lowder, A. C. and Osburn, W. N. (2010). "Inclusion of blended lipid solutions as functional ingredients to alter the fatty acid profile of beef patties." Journal of Food Science **75**(7): S355-S364.

- Lurueña-Martínez, M. A., Vivar-Quintana, A. M. and Revilla, I. (2004). "Effect of locust bean/xanthan gum addition and replacement of pork fat with olive oil on the quality characteristics of low-fat frankfurters." Meat Science **68**(3): 383-389.
- Lutz, R., Aserin, A., Wicker, L. and Garti, N. (2009). "Release of electrolytes from W/O/W double emulsions stabilized by a soluble complex of modified pectin and whey protein isolate." Colloids Surf B Biointerfaces **74**(1): 178-185.
- MAPAMA (2016a). Alimentación mes a mes 2016. España, Ministerio de Agricultura, Pesca, Alimentación y Medio Ambiente.
- MAPAMA (2016b). Informe del consumo de alimentación en España, 2015. Madrid.
- Márquez, A. L. and Wagner, J. R. (2010). "Rheology of double (w/o/w) emulsions prepared with soybean milk and fortified with calcium." Journal of Texture Studies **41**(5): 651-671.
- Marquez, E., Ahmed, E. M., Shireman, R. B., Cornell, J. A. and West, R. L. (1989). "Dietary-effects of frankfurters with added beef fat and peanut oil." Journal of Food Science **54**(3): 497-&.
- Matalanis, A., Decker, E. A. and McClements, D. J. (2012). "Inhibition of lipid oxidation by encapsulation of emulsion droplets within hydrogel microspheres." Food Chemistry **132**(2): 766-772.
- Mateos, R., Goya, L. and Bravo, L. (2004). "Determination of malondialdehyde by liquid chromatography as the 2,4-dinitrophenylhydrazone derivative - A marker for oxidative stress in cell cultures of human hepatoma HepG2." Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences **805**(1): 33-39.
- Matos, M., Gutierrez, G., Coca, J. and Pazos, C. (2014). "Preparation of water-in-oil-in-water (W₁/O/W₂) double emulsions containing trans-resveratrol." Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects **442**: 69-79.
- McAfee, A. J., McSorley, E. M., Cuskelly, G. J., Moss, B. W., Wallace, J. M. W., Bonham, M. P. and Fearon, A. M. (2010). "Red meat consumption: An overview of the risks and benefits." Meat Science **84**(1): 1-13.
- McClements, D. J. (2010). "Emulsion Design to Improve the Delivery of Functional Lipophilic Components." Annual Review of Food Science and Technology, Vol 1 **1**: 241-269.
- McClements, D. J. (2012a). "Advances in fabrication of emulsions with enhanced functionality using structural design principles." Current Opinion in Colloid & Interface Science **17**(5): 235-245.
- McClements, D. J. (2012b). "Crystals and crystallization in oil-in-water emulsions: Implications for emulsion-based delivery systems." Advances in Colloid and Interface Science **174**: 1-30.
- McClements, D. J. (2015). Food emulsions: principles, practices, and techniques, CRC press.
- McClements, D. J. and Decker, E. A. (2000). "Lipid Oxidation in Oil-in-Water Emulsions: Impact of Molecular Environment on Chemical Reactions in Heterogeneous Food Systems." Journal Food Science **65**(8): 1270-1282.
- McClements, D. J., Decker, E. A., Park, Y. and Weiss, J. (2009). "Structural design principles for delivery of bioactive components in nutraceuticals and functional foods." Critical Reviews in Food Science and Nutrition **49**(6): 577-606.
- Medina, I., Lois, S., Alcantara, D., Lucas, R. and Morales, J. C. (2009). "Effect of lipophilization of hydroxytyrosol on its antioxidant activity in fish oils and fish oil-in-water emulsions." Journal of Agricultural and Food Chemistry **57**(20): 9773-9779.

- Medina-Martinez, M. S., Truchado, P., Castro-Ibanez, I. and Allende, A. (2016). "Antimicrobial activity of hydroxytyrosol: a current controversy." Bioscience Biotechnology and Biochemistry **80**(4): 801-810.
- Mehrnia, M.-A., Jafari, S.-M., Makhmal-Zadeh, B. S. and Maghsoudlou, Y. (2017). "Rheological and release properties of double nano-emulsions containing crocin prepared with Angum gum, Arabic gum and whey protein." Food Hydrocolloids **66**: 259-267.
- Mehta, N., Ahlawat, S. S., Sharma, D. P. and Dabur, R. S. (2015). "Novel trends in development of dietary fiber rich meat products-a critical review." Journal of Food Science and Technology-Mysore **52**(2): 633-647.
- Micha, R., Wallace, S. K. and Mozaffarian, D. (2010). "Red and Processed Meat Consumption and Risk of Incident Coronary Heart Disease, Stroke, and Diabetes Mellitus A Systematic Review and Meta-Analysis." Circulation **121**(21): 2271-U2252.
- Min, B., Nam, K. C., Cordray, J. and Ahn, D. U. (2008). "Endogenous factors affecting oxidative stability of beef loin, pork loin, and chicken breast and thigh meats." Journal of Food Science **73**(6): C439-C446.
- Minyi, H. and Bertram, H. C. (2017). "Designing healthier comminuted meat products: effect of dietary fibers on water distribution and texture of a fat-reduced meat model system." Meat Science **133**: 159-165.
- Molina, E., Papadopoulou, A. and Ledward, D. A. (2001). "Emulsifying properties of high pressure treated soy protein isolate and 7S and 11S globulins." Food Hydrocolloids **15**(3): 263-269.
- Montes de Oca-Avalos, J. M., Huck-Iriart, C., Candal, R. J. and Herrera, M. L. (2016). "Sodium Caseinate/Sunflower Oil Emulsion-Based Gels for Structuring Food." Food and Bioprocess Technology **9**(6): 981-992.
- Morr, C. V. and Ha, E. Y. W. (1993). "Whey protein concentrates and isolates: Processing and functional properties." Critical Reviews in Food Science and Nutrition **33**(6): 431-476.
- Muguerza, E., Gimeno, O., Ansorena, D., Bloukas, J. G. and Astiasaran, I. (2001). "Effect of replacing pork backfat with pre-emulsified olive oil on lipid fraction and sensory quality of Chorizo de Pamplona - a traditional Spanish fermented sausage." Meat Science **59**(3): 251-258.
- Mulero, J., Zafrilla, P., Martínez-Cachá, A., Leal, M. and Abellán, J. (2011). "Péptidos bioactivos." Clínica e Investigación en Arteriosclerosis **23**(5): 219-227.
- Muscholik, G. (2007). "Multiple emulsions for food use." Current Opinion in Colloid & Interface Science **12**(4-5): 213-220.
- Muscholik, G. and Dickinson, E. (2017). "Double Emulsions Relevant to Food Systems: Preparation, Stability, and Applications." Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety **16**(3): 532-555.
- Nelson, D. L., Lehninger, A. L. and Cox, M. M. (2008). Lehninger principles of biochemistry, Macmillan.
- Norat, T., Lukanova, A., Ferrari, P. and Riboli, E. (2002). "Meat consumption and colorectal cancer risk: Dose-response meta-analysis of epidemiological studies." International Journal of Cancer **98**(2): 241-256.
- Nordoy, A., Marchioli, R., Arnesen, H. and Videbaek, J. (2001). "n-3 polyunsaturated fatty acids and cardiovascular diseases." Lipids **36**: S127-S129.
- Norn, V. (2014). Emulsifiers in Food Technology, Wiley.
- Norton, I. T. and Norton, J. E. (2010). "Designer colloids—towards healthy everyday foods?" Soft Matter **6**(16): 3735-3742.

O'Regan, J. and Mulvihill, D. M. (2010). "Sodium caseinate–maltodextrin conjugate stabilized double emulsions: Encapsulation and stability." Food Research International **43**(1): 224-231.

OECD/EU (2016). Health at a Glance: Europe 2016: State of Health in the EU Cycle. Paris, OECD Publishing.

Oezvural, E. B. and Vural, H. (2008). "Utilization of interesterified oil blends in the production of frankfurters." Meat Science **78**(3): 211-216.

Oliver, L., Wieck, L. and Scholten, E. (2016). "Influence of matrix inhomogeneity on the rheological properties of emulsion-filled gels." Food Hydrocolloids **52**: 116-125.

Olmedilla-Alonso, B., Jiménez Colmenero, F. and Sánchez-Muniz, F. J. (2004). La carne y productos cárnicos como alimentos funcionales.

Olmedilla-Alonso, B. and Jiménez-Colmenero, F. (2014). "Functional meat products; development and evaluation of their health-promoting properties." Nutrición Hospitalaria **29**(6): 1197-1209.

Olmedilla-Alonso, B., Jiménez-Colmenero, F. and Sanchez-Muniz, F. J. (2013). "Development and assessment of healthy properties of meat and meat products designed as functional foods." Meat Science **95**(4): 919-930.

OMS (2003). Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. WHO Technical Report Series 916. Geneva.

OMS (2013). Plan de acción mundial para la prevención y el control de las enfermedades no transmisibles 2013-2020. Ginebra, OMS.

OMS (2015). The global prevalence of anaemia in 2011. Ginebra, Organización Mundial de la Salud.

Owusu, R. K., Zhu, Q. H. and Dickinson, E. (1992). "Controlled release of l-tryptophan and vitamin-b2 from model water oil-water multiple emulsions." Food Hydrocolloids **6**(5): 443-453.

Ozturk, B., Urgu, M. and Serdaroglu, M. (2017). "Egg white powder-stabilised multiple (water-in-olive oil-in-water) emulsions as beef fat replacers in model system meat emulsions." Journal of the Science of Food and Agriculture **97**(7): 2075-2083.

Paddon-Jones, D., Westman, E., Mattes, R. D., Wolfe, R. R., Astrup, A. and Westerterp-Plantenga, M. (2008). "Protein, weight management, and satiety." American Journal of Clinical Nutrition **87**(5): 1558S-1561S.

Pal, R. (2011). "Rheology of simple and multiple emulsions." Current Opinion in Colloid & Interface Science **16**(1): 41-60.

Paradiso, V. M., Di Mattia, C., Giarnetti, M., Chiarini, M., Andrich, L. and Caponio, F. (2016). "Antioxidant Behavior of Olive Phenolics in Oil-in-Water Emulsions." Journal of Agricultural and Food Chemistry **64**(29): 5877-5886.

Park, J., Rhee, K. S., Keeton, J. T. and Rhee, K. C. (1989). "Properties of low-fat frankfurters containing monounsaturated and omega-3 poly-unsaturated oils." Journal of Food Science **54**(3): 500-504.

Park, J., Rhee, K. S. and Ziprin, Y. A. (1990). "Low-fat frankfurters with elevated levels of water and oleic-acid." Journal of Food Science **55**(3): 871-&.

Patel, A. R. and Dewettinck, K. (2016). "Edible oil structuring: an overview and recent updates." Food & Function **7**(1): 20-29.

- Patel, A. R., Rodriguez, Y., Lesaffer, A. and Dewettinck, K. (2014). "High internal phase emulsion gels (HIPE-gels) prepared using food-grade components." Rsc Advances **4**(35): 18136-18140.
- Pawlik, A., Cox, P. W. and Norton, I. T. (2010). "Food grade duplex emulsions designed and stabilised with different osmotic pressures." Journal of Colloid and Interface Science **352**(1): 59-67.
- Pazos, M., Alonso, A., Sánchez, I. and Medina, I. (2008). "Hydroxytyrosol prevents oxidative deterioration in foodstuffs rich in fish lipids." Journal of Agricultural and Food Chemistry **56**(9): 3334-3340.
- Pelser, W. M., Linssen, J. P. H., Legger, A. and Houben, J. H. (2007). "Lipid oxidation in n-3 fatty acid enriched Dutch style fermented sausages." Meat Science **75**(1): 1-11.
- Pérez-Alonso, C., Alamilla-Beltrán, L., Varela-Guerrero, V., Carrillo-Navas, H., Vernon-Carter, E. J. and Cruz-Olivares, J. (2012). "Rheological properties of a double emulsion nutraceutical system incorporating chia essential oil and ascorbic acid stabilized by carbohydrate polymer-protein blends." Carbohydrate Polymers **87**(2): 1231-1235.
- Perez-Jiménez, J., Arranz, S., Tabernero, M., Diaz-Rubio, M. E., Serrano, J., Goni, I. and Saura-Calixto, F. (2008). "Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of." Food Research International **41**(3): 274-285.
- Phan, T. T., Harwell, J. H. and Sabatini, D. A. (2010). "Effects of triglyceride molecular structure on optimum formulation of surfactant-oil-water systems." Journal of Surfactants and Detergents **13**(2): 189-194.
- Pimentel-González, D. J., Campos-Montiel, R. G., Lobato-Calleros, C., Pedroza-Islas, R. and Vernon-Carter, E. J. (2009). "Encapsulation of *Lactobacillus rhamnosus* in double emulsions formulated with sweet whey as emulsifier and survival in simulated gastrointestinal conditions." Food Research International **42**(2): 292-297.
- Pintado, T., Herrero, A. M., Jiménez-Colmenero, F. and Ruiz-Capillas, C. (2016a). "Emulsion gels as potential fat replacers delivering beta-glucan and healthy lipid content for food applications." Journal of Food Science and Technology-Mysore **53**(12): 4336-4347.
- Pintado, T., Herrero, A. M., Jiménez-Colmenero, F. and Ruiz-Capillas, C. (2016b). "Strategies for incorporation of chia (*Salvia hispanica* L.) in frankfurters as a health-promoting ingredient." Meat Science **114**: 75-84.
- Pintado, T., Herrero, A. M., Ruiz-Capillas, C., Triki, M., Carmona, P. and Jiménez-Colmenero, F. (2016c). "Effects of emulsion gels containing bioactive compounds on sensorial, technological, and structural properties of frankfurters." Food Science and Technology International **22**(2): 132-145.
- Pintado, T., Jiménez-Colmenero, F., Carmona, P., Ruiz-Capillas, C. and Herrero, A. M. (2015a). "Oil-in-water emulsion gels stabilized with chia (*Salvia hispanica* L.) and cold gelling agents: Technological and infrared spectroscopic characterization." Food Chemistry **185**: 470-478.
- Pintado, T., Ruiz-Capillas, C., Jiménez-Colmenero, F., Carmona, P. and Herrero, A. M. (2015b). "Oil-in-water emulsion gels stabilized with chia (*Salvia hispanica* L.) and cold gelling agents: Technological and infrared spectroscopic characterization." Food Chemistry **185**: 470-478.
- Poyato, C., Ansorena, D., Berasategi, I., Navarro-Blasco, I. and Astiasaran, I. (2014). "Optimization of a gelled emulsion intended to supply omega-3 fatty acids into meat products by means of response surface methodology." Meat Science **98**(4): 615.
- Poyato, C., Astiasaran, I., Barriuso, B. and Ansorena, D. (2015). "A new polyunsaturated gelled emulsion as replacer of pork back-fat in burger patties: Effect on lipid composition, oxidative stability and sensory acceptability." LWT - Food Science and Technology **62**(2): 1069-1075.

- Poyato, C., Navarro-Blasco, I., Calvo, M. I., Cavero, R. Y., Astiasarán, I. and Ansorena, D. (2013). "Oxidative stability of O/W and W/O/W emulsions: Effect of lipid composition and antioxidant polarity." Food Research International **51**(1): 132-140.
- Prior, R. L., Wu, X. L. and Schaich, K. (2005). "Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements." Journal of Agricultural and Food Chemistry **53**(10): 4290-4302.
- Raes, K., De Smet, S. and Demeyer, D. (2004). "Effect of dietary fatty acids on incorporation of long chain polyunsaturated fatty acids and conjugated linoleic acid in lamb, beef and pork meat: a review." Animal Feed Science and Technology **113**(1-4): 199-221.
- Riserus, U., Willett, W. C. and Hu, F. B. (2009). "Dietary fats and prevention of type 2 diabetes." Progress in Lipid Research **48**(1): 44-51.
- Roberfroid, M. B. (2000). "Concepts and strategy of functional food science: the European perspective." The American journal of Clinical Nutrition **71**(6): 1660s-1664s.
- Rodis, P. S., Karathanos, V. T. and Mantzavinou, A. (2002). "Partitioning of Olive Oil Antioxidants between Oil and Water Phases." Journal of Agricultural and Food Chemistry **50**(3): 596-601.
- Rodríguez-Carpena, J. G., Morcuende, D. and Estévez, M. (2011). "Partial Replacement of Pork Back-Fat by Vegetable Oils in Burger Patties: Effect on Oxidative Stability and Texture and Color Changes during Cooking and Chilled Storage." Journal of Food Science **76**(7): C1025-C1031.
- Rodríguez-Huezo, M. E., Pedroza-Islas, R., Prado-Barragan, L. A., Beristain, C. I. and Vernon-Carter, E. J. (2004). "Microencapsulation by spray drying of multiple emulsions containing carotenoids." Journal of Food Science **69**(7): E351-E359.
- Rouhani, M. H., Salehi-Abargouei, A., Surkan, P. J. and Azadbakht, L. (2014). "Is there a relationship between red or processed meat intake and obesity? A systematic review and meta-analysis of observational studies." Obesity Reviews **15**(9): 740-748.
- Rubio, C., González Weller, D., Martín-Izquierdo, R. E., Revert, C., Rodríguez, I. and Hardisson, A. (2007). "El zinc: oligoelemento esencial." Nutrición Hospitalaria **22**: 101-107.
- Ruiz-Capillas, C., Carmona, P., Jiménez-Colmenero, F. and Herrero, A. M. (2013). "Oil bulking agents based on polysaccharide gels in meat batters: A Raman spectroscopic study." Food Chemistry **141**(4): 3688-3694.
- Ruusunen, M. and Puolanne, E. (2005). "Reducing sodium intake from meat products." Meat Science **70**(3): 531-541.
- Ryan, J. T., Ross, R. P., Bolton, D., Fitzgerald, G. F. and Stanton, C. (2011). "Bioactive Peptides from Muscle Sources: Meat and Fish." Nutrients **3**(9): 765-791.
- Sagiri, S. S., Behera, B., Rafanan, R. R., Bhattacharya, C., Pal, K., Banerjee, I. and Rousseau, D. (2014a). "Organogels as Matrices for Controlled Drug Delivery: A Review on the Current State." Soft Materials **12**(1): 47-72.
- Sagiri, S. S., Pal, K., Basak, P., Rana, U. A., Shakir, I. and Anis, A. (2014b). "Encapsulation of sorbitan ester-based organogels in alginate microparticles." AAPS Pharma Science Technology **15**(5): 1197-1208.
- Saiga, A., Tanabe, S. and Nishimura, T. (2003). "Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment." Journal of Agricultural and Food Chemistry **51**(12): 3661-3667.

Salcedo Sandoval, J. L. (2015). Agente de carga a base de konjac y partículas de hidrogel como nuevos sistemas de incorporación de aceites en productos cárnicos, Universidad Complutense de Madrid. Tesis doctoral.

Salcedo-Sandoval, L., Cofrades, S., Ruiz-Capillas, C., Carballo, J. and Jiménez-Colmenero, F. (2015a). "Konjac-based oil bulking system for development of improved-lipid pork patties: Technological, microbiological and sensory assessment." Meat Science **101**: 95-102.

Salcedo-Sandoval, L., Cofrades, S., Ruiz-Capillas, C. and Jiménez-Colmenero, F. (2014). "Effect of cooking method on the fatty acid content of reduced-fat and PUFA-enriched pork patties formulated with a konjac-based oil bulking system." Meat Science **98**(4): 795.

Salcedo-Sandoval, L., Cofrades, S., Ruiz-Capillas, C. and Jiménez-Colmenero, F. (2015b). "Filled hydrogel particles as a delivery system for n-3 long chain PUFA in low-fat frankfurters: Consequences for product characteristics with special reference to lipid oxidation." Meat Science **110**: 160-168.

Salcedo-Sandoval, L., Cofrades, S., Ruiz-Capillas, C., Solas, M. T. and Jiménez-Colmenero, F. (2013). "Healthier oils stabilized in konjac matrix as fat replacers in n-3 PUFA enriched frankfurters." Meat Science **93**(3): 757-766.

Salcedo-Sandoval, L., Ruiz-Capillas, C., Cofrades, S., Triki, M. and Jiménez-Colmenero, F. (2015c). "Shelf-life of n-3 PUFA enriched frankfurters formulated with a konjac-based oil bulking agent." LWT - Food Science and Technology **62**(1): 711.

Salminen, H., Herrmann, K. and Weiss, J. (2013). "Oil-in-water emulsions as a delivery system for n-3 fatty acids in meat products." Meat Science **93**(3): 659-667.

Sánchez-Muniz, F. J. (2007). "Olive oil, life key in the Mediterranean area." Anales De La Real Academia Nacional De Farmacia **73**(3): 653-692.

Sánchez-Muniz, F. J. and Nus, M. (2008). Importancia de la interacción dieta-genética en la prevención cardiovascular. Genética, nutrición y enfermedad, Edimsa.

Sanchez-Muniz, F. J., Olivero-David, R., Triki, M., Salcedo, L., Gonzalez-Munoz, M. J., Cofrades, S., Ruiz-Capillas, C., Jiménez-Colmenero, F. and Benedi, J. (2012). "Antioxidant activity of Hypericum perforatum L. extract in enriched n-3 PUFA pork meat systems during chilled storage." Food Research International **48**(2): 909-915.

Sanchez-Muniz, F. J., Oubina, P., Benedi, J., Rodenas, S. and Cuesta, C. (1998). "A preliminary study on platelet aggregation in postmenopausal women consuming extra-virgin olive oil and high-oleic acid sunflower oil." Journal of the American Oil Chemists Society **75**(2): 217-223.

Santarelli, R. L., Pierre, F. and Corpet, D. E. (2008). "Processed meat and colorectal cancer: A review of epidemiologic and experimental evidence." Nutrition and Cancer-an International Journal **60**(2): 131-144.

Santarelli, R. L., Vendevre, J. L., Naud, N., Tache, S., Gueraud, F., Viau, M., Genot, C., Corpet, D. E. and Pierre, F. H. F. (2010). "Meat Processing and Colon Carcinogenesis: Cooked, Nitrite-Treated, and Oxidized High-Heme Cured Meat Promotes Mucin-Depleted Foci in Rats." Cancer Prevention Research **3**(7): 852-864.

Sapei, L., Naqvi, M. A. and Rousseau, D. (2012). "Stability and release properties of double emulsions for food applications." Food Hydrocolloids **27**(2): 316-323.

Sato, A. C. K., Moraes, K. and Cunha, R. L. (2014). "Development of gelled emulsions with improved oxidative and pH stability." Food Hydrocolloids **34**(1): 184-192.

- Seccombe, D. W., James, L., Hahn, P. and Jones, E. (1987). "L-carnitine treatment in the hyperlipidemic rabbit." Metabolism-Clinical and Experimental **36**(12): 1192-1196.
- Serdaroglu, M., Ozturk, B. and Urgu, M. (2016). "Emulsion characteristics, chemical and textural properties of meat systems produced with double emulsions as beef fat replacers." Meat Science **117**: 187-195.
- Serrano, A., Cofrades, S. and Jiménez-Colmenero, F. (2006). "Characteristics of restructured beef steak with different proportions of walnut during frozen storage." Meat Science **72**: 108-115.
- Shima, M., Matsuo, T., Yamashita, M. and Adachi, S. (2009). "Protection of *Lactobacillus acidophilus* from bile salts in a model intestinal juice by incorporation into the inner-water phase of a W/O/W emulsion." Food Hydrocolloids **23**(2): 281-285.
- Shimura, S. and Hasegawa, T. (1993). "Changes of lipid concentrations in liver and serum by administration of carnitine added diets in rats." Journal of Veterinary Medical Science **55**(5): 845-847.
- Simopoulos, A. P. (1991). "Omega-3-fatty-acids in health and disease and in growth and development." American Journal of Clinical Nutrition **54**(3): 438-463.
- Siri-Tarino, P. W., Sun, Q., Hu, F. B. and Krauss, R. M. (2010). "Meta-analysis of prospective cohort studies evaluating the association of saturated fat with cardiovascular disease." The American Journal of Clinical Nutrition.
- Siro, I., Kapolna, E., Kapolna, B. and Lugasi, A. (2008). "Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance-A review." Appetite **51**(3): 456-467.
- Steffen, L. M., Kroenke, C. H., Yu, X. H., Pereira, M. A., Slattery, M. L., Van Horn, L., Gross, M. D. and Jacobs, D. R. (2005). "Associations of plant food, dairy product, and meat intakes with 15-y incidence of elevated blood pressure in young black and white adults: the Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA) Study." American Journal of Clinical Nutrition **82**(6): 1169-1177.
- Su, J. (2008). Formation and Stability of Food-Grade Water-in -Oil-in-Water Emulsion, Riddet Institute, Massey University. Tesis doctoral.
- Su, J., Flanagan, J., Hemar, Y. and Singh, H. (2006). "Synergistic effects of polyglycerol ester of polyricinoleic acid and sodium caseinate on the stabilisation of water-oil-water emulsions." Food Hydrocolloids **20**(2-3): 261-268.
- Surh, J., Vladislavljević, G. T., Mun, S., McClements, D. J. and (2007). "Preparation and Characterization of Water/Oil and Water/Oil/Water Emulsions Containing Biopolymer-Gelled Water Droplets." Journal of Agriculture and Food chemistry **55**(1): 175-184.
- Tall, A. R. (1998). "An overview of reverse cholesterol transport." European Heart Journal **19**: A31-A35.
- Tavernier, I., Patel, A. R., Van der Meeren, P. and Dewettinck, K. (2017). "Emulsion-templated liquid oil structuring with soy protein and soy protein: kappa-carrageenan complexes." Food Hydrocolloids **65**: 107-120.
- Temme, E. H. M., Mensink, R. P. and Hornstra, G. (1996). "Comparison of the effects of diets enriched in lauric, palmitic, or oleic acids on serum lipids and lipoproteins in healthy women and men." American Journal of Clinical Nutrition **63**(6): 897-903.
- Tran, T. (2011). "Stabilization of oil-in-water emulsions via soy protein and soy soluble polysaccharide interactions." Molecular Science.

- Triki, M., Herrero, A. M., Jiménez-Colmenero, F. and Ruiz-Capillas, C. (2013). "Storage stability of low-fat sodium reduced fresh merguez sausage prepared with olive oil in konjac gel matrix." Meat Science **94**(4): 438-446.
- van Nieuwenhuyzen, W. and Tomas, M. C. (2008). "Update on vegetable lecithin and phospholipid technologies." European Journal of Lipid Science and Technology **110**(5): 472-486.
- Vang, A., Singh, P. N., Lee, J. W., Haddad, E. H. and Brinegar, C. H. (2008). "Meats, processed meats, obesity, weight gain and occurrence of diabetes among adults: Findings from Adventist Health Studies." Annals of Nutrition and Metabolism **52**(2): 96-104.
- Verma, A. K., Sharma, B. D. and Banerjee, R. (2010). "Effect of sodium chloride replacement and apple pulp inclusion on the physico-chemical, textural and sensory properties of low fat chicken nuggets." LWT - Food Science and Technology **43**(4): 715-719.
- Vingerhoeds, M. H., de Wijk, R. A., Zoet, F. D., Nixdorf, R. R. and van Aken, G. A. (2008). "How emulsion composition and structure affect sensory perception of low-viscosity model emulsions." Food Hydrocolloids **22**(4): 631-646.
- Vural, H. (2003). "Effect of replacing beef fat and tail fat with interesterified plant oil on quality characteristics of Turkish semi-dry fermented sausages." European Food Research and Technology **217**(2): 100-103.
- Vural, H., Javidipour, I. and Ozbas, O. O. (2004). "Effects of interesterified vegetable oils and sugarbeet fiber on the quality of frankfurters." Meat Science **67**(1): 65-72.
- Wang, C. C., Harris, W. S., Chung, M., Lichtenstein, A. H., Balk, E. M., Kupelnick, B., Jordan, H. S. and Lau, J. (2006). "n-3 fatty acids from fish or fish-oil supplements, but not alpha-linolenic acid, benefit cardiovascular disease outcomes in primary- and secondary-prevention studies: a systematic review." American Journal of Clinical Nutrition **84**(1): 5-17.
- Wang, Y. and Beydoun, M. A. (2009). "Meat consumption is associated with obesity and central obesity among US adults." International Journal of Obesity **33**(6): 621-628.
- Waraho, T., Cardia, V., Decker, E. A. and McClements, D. J. (2010). Lipid oxidation in emulsified food products. Oxidation in foods and beverages and antioxidant applications. W. Publishing. Philadelphia, PA.
- WCR/AICR (2007). World cancer research fund/American institute for cancer research, food, nutrition, physical activity and the prevention of cancer: A global perspective. Washington, DC.
- Weel, K., Boelrijk, A., Burger, J., Jacobs, M., Gruppen, H., Voragen, A. and Smit, G. (2004). "Effect of emulsion properties on release of esters under static headspace, in vivo, and artificial throat conditions in relation to sensory intensity." Journal of Agricultural and Food Chemistry **52**(21): 6572-6577.
- Weiss, J., Gibis, M., Schuh, V. and Salminen, H. (2010). "Advances in ingredient and processing systems for meat and meat products." Meat Science **86**(1): 196-213.
- Weiss, J., Scherze, I., Muschiolik, G. and (2005). "Polysaccharide gel with multiple emulsion." Food Hydrocolloids **19**(3): 605-615.
- Welch, A. A., Shrestha, S. S., Lentjes, M. A. H., Wareham, N. J. and Khaw, K. T. (2010). "Dietary intake and status of n-3 polyunsaturated fatty acids in a population of fish-eating and non-fish-eating meat-eaters, vegetarians, and vegans and the precursor-product ratio of alpha-linolenic acid to long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids results from the EPIC-Norfolk cohort." American Journal of Clinical Nutrition **92**(5): 1049-1051.
- West, R. L., Márquez, E. J., Ahmed, E. M. and Johnson, D. D. (1989). "Emulsion Stability and Sensory Quality of Beef Frankfurters Produced at Different Fat or Peanut Oil Levels." Journal of Food Science **54**(4): 867-870.

West, L. M., Márquez E. J., Ahmed E. M. and Johnson, D. D. (1989) "Emulsion stability and Sensory Quality of Beef Frankfurter Produced at Different Fat of Penaut oil Levels." Journal of Food Science 54(4) 867-870.

Whigham, L. D., Watras, A. C. and Schoeller, D. A. (2007). "Efficacy of conjugated linoleic acid for reducing fat mass: a meta-analysis in humans." American Journal of Clinical Nutrition 85(5): 1203-1211.

Whitehurst, R. J. (2008). Emulsifiers in Food Technology, Wiley.

Willett, W. C., Stampfer, M. J., Colditz, G. A., Rosner, B. A. and Speizer, F. E. (1990). "Relation of meat, fat, and fiber intake to the risk of colon cancer in a prospective-study among women." New England Journal of Medicine 323(24): 1664-1672.

Wood, J. D., Richardson, R. I., Nute, G. R., Fisher, A. V., Campo, M. M., Kasapidou, E., Sheard, P. R. and Enser, M. (2004). "Effects of fatty acids on meat quality: a review." Meat Science 66(1): 21-32.

Wyness, L. (2016). "The role of red meat in the diet: nutrition and health benefits." Proceedings of the Nutrition Society 75(3): 227-232.

Wyness, L., Weichselbaum, E., O'connor, A., Williams, E., Benelam, B., Riley, H. and Stanner, S. (2011). "Red meat in the diet: an update." Nutrition Bulletin 36(1): 34-77.

Xiong, G. Y., Wang, P., Zheng, H. B., Xu, X. L., Zhu, Y. Y. and Zhou, G. H. (2016). "Effects of Plant Oil Combinations Substituting Pork Back-Fat Combined with Pre-Emulsification on Physicochemical, Textural, Microstructural and Sensory Properties of Spreadable Chicken Liver PaTE." Journal of Food Quality 39(4): 331-341.

Young, K. W. and Whittle, K. J. (1985). "Color measurement of fish minces using hunter L a, b values." Journal of the Science of Food and Agriculture 36(5): 383-392.

Yu, S. M., Derr, J., Etherton, T. D. and Krisetherton, P. M. (1995). "Plasma cholesterol-predictive equations demonstrate that stearic-acid is neutral and monounsaturated fatty-acids are hypocholesterolemic." American Journal of Clinical Nutrition 61(5): 1129-1139.

Zetzl, A. K., Marangoni, A. G. and Barbut, S. (2012). "Mechanical properties of ethylcellulose oleogels and their potential for saturated fat reduction in frankfurters." Food & Function 3(3): 327-337.